

Doktori értekezés

Kömyezeti tényezők hatása a növényi jelátviteli rendszer egy elemére, a kalcium-függő, kalmodulin-független protein kináz működésére

Írta: Pestenáczy Anikó
Témavezető: Dr. Erdei László

Növényélettani Tanszék
Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
és
Biofizikai Intézet
MTA, Szegedi Biológiai Központja

2001

Tartalomjegyzék

	oldal
Rövidítések jegyzéke	1
1. Bevezetés	2
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1 Környezeti hatások	4
2.1.1 Stressz és adaptáció	4
2.1.2 Szárazságstressz	6
2.1.3 Sóstressz és sótolerancia	7
2.1.4 UV-B stressz	11
2.2 Jelátviteli folyamatok	13
2.2.1 A kalcium-közvetített jelátvitel néhány jellemzője	13
2.2.2 CDPK típusok	16
2.2.3 A CDPK néhány jellemzője és stressz-indukciója	20
2.3 Az abszcizinsav szerepe a stresszválaszokban	22
2.3.1 Az abszcizinsav általános jellemzői	22
2.3.2 Az abszcizinsav szerepe a stresszválaszokban	23
3. Célkitűzések	27
4. Anyagok és módszerek	28
4.1 Növénynevelés és kezelések	28
4.1.1. Növénynevelés	28
4.1.2. Kezelések	29
4.2 Citoplazmatikus fehérjék kivonása	30
4.3 Fehérjetartalom mérés	30
4.4 Fehérjék radioaktív jelölése	30
4.5 Jelölt fehérjék kimutatása	31
4.6 CDPK aktivitás mérés	32
4.7 A tanninok és az ellagsav	33
4.8 Atomabszorpciós mérések	34
4.9 Felhasznált anyagok	34

5. Eredmények összefoglalása	35
5.1 A CDPK néhány biokémiai jellemzője	35
5.1.1 Általános jellemzők	35
5.1.2 Aktivitás mérések, exogén szubsztrát foszforilálása és gátlása	38
5.2 A CDPK stresszindukciója	40
5.2.1 Ozmotikus indukció, koncentráció- és időfüggés	40
5.2.2 NaCl-indukált változások a CDPK autofoszforilációs aktivitásában	44
5.2.2.1 A NaCl-os kezelés hatása a glükofita búzára	44
5.2.2.2 A NaCl-os kezelés hatása a halofita <i>Aster tripolium</i> -ra	47
5.2.3 UV-B-indukált változások a CDPK autofoszforilációs aktivitásában	50
5.2.4 Abszcizinsavas előkezelés hatása az ozmotikus indukcióra	52
6. Eredmények értékelése	54
7. Összefoglalás	62
8. Irodalomjegyzék	65
9. Köszönetnyilvánítás	73
10. Summary	74

Rövidítések jegyzéke

ABS	abszcizinsav
cAK	ciklikus AMP-függő protein kináz
APX	aszcorbinsav peroxidáz
AtCBL	<i>Arabidopsis</i> calcineurin B-típusú fehérje
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	marha szérum albumin
CDPK	kalcium-függő kalmodulin-független protein kináz
Da, kDa	dalton, kilodalton
EDTA	dinátrium-etiléndiamin-tetraecetsav
EGTA	etilénglikol-bisz-(β -aminoetiléter) N,N'-tetra-ecetsav
GAS	általános adaptációs szindróma
cGMP	ciklikus guanidin-monofoszfát
GR	glutation reduktáz
MES	2-(N-morfolino) etán-szulfonsav 1-hidrát
MLCK	miozin könnyű lánc kináz
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PEG	polietilén glikol
PKC	protein kináz C
PVPP	polivinil-polipirrolidon
SDS	nátrium-dodecilszulfát
SOD	szuperoxid-dizmutáz
TCA	triklór-ecetsav
TFP	trifluoperazin
Tris	tris(hidroximetil)-aminometán

1. Bevezetés

Minden élőlény a környezetével szoros kölcsönhatásban éli le életét. A növények és az állatok sok tekintetben eltérően válaszolnak az őket ért ingerekre, környezeti hatásokra, mégis számos azonos vagy nagyon hasonló vonás található bennük. Különösen igaz ez akkor, ha a jelátviteli folyamatok biokémiáját tanulmányozzuk.

A legtöbb környezeti hatás, biotikus és abiotikus egyaránt, megváltoztatja a citoplaszma néhány jelátvivő molekulájának, elsősorban a kalciumnak a szintjét. A különféle ingerek, stressz hatások egyedi kalcium-jelet hoznak létre (Pandey és mtsai, 2000) és teszik az egyik legfontosabb másodlagos hírvivő molekulává ezt a fiziológiailag is fontos kationt a növények számára. A jel továbbításában és felerősítésében kalcium-kötő fehérjék, valamint a fehérjék foszforilációját szabályozó kinázok és foszfatázok vesznek részt. A növényekben gyakori kalcium-függő, de kalmodulin-független protein kinázok (CDPK) nagyfokú szekvencia homológiája a patkány agyi mikroerek endotél sejtjeiből izolált kalcium/kalmodulin-függő protein kinázokkal (CaMKII) jól tükrözi a növényi és az állatokban leírt jelátviteli folyamatok hasonlóságát.

A CDPK a kalcium-függő vagy más néven kalmodulin-szerű fehérjerészt tartalmazó protein kinázok nagycsaládjába tartozik, amelyekre jellemző, hogy aktiválásuk nem minden esetben igényel kalmodulint. A fehérje C-terminálján lévő kalcium-kötő domén különböző mértékű, CDPK esetében közel 40 %-os szekvencia azonosságot mutat a kalmodulinnal, és típustól függően 3 ill. 4 EF-hand-et, azaz kalcium-kötő domént tartalmaz. Ez elegendő a kalcium megkötéséhez és így a kináz aktív állapotának létrehozásához.

Dolgozatom a számos protein kináz közül a kalcium-függő, de kalmodulin-független protein kinázzal (CDPK) foglalkozik, amelyet Harmon és munkatársai írtak le 1987-ben, molekuláris jellemzését pedig Harper és munkatársai adták meg 1991-ben. Néhány különböző stressztoleranciájú gabonanövényből (búza, kukorica, kenyércirok) és egy tengerparti növényből (*Aster tripolium*) izolált CDPK néhány biokémiai jellemzőjével foglalkoztam, majd megfigyeltem a CDPK stressz-indukcióját, annak dózis-, és kezelési időtől való függését az aktivitás ill.

autofoszforilációs mintázatok nyomonkövetésével.

Különböző környezeti hatások, szárazság- és sóstressz, hormonok és mechanikai ingerek a kalcium-szint változása mellett általában abszcizinsav szint emelkedéssel is járnak, de a fordítottja is igaz, hogy az endogén és az exogén abszcizinsav hatásmechanizmusát többnyire a citoplazmatikus kalcium-szint változása kíséri (Knight és mtsai, 1992). A CDPK-k és a stressz-abszcizinsav egymással szoros kölcsönhatásban szabályozzák az adaptációs folyamatokat. A növény stressztoleranciájához, túléléséhez nagyban hozzájárulnak a megfelelő körülmények közt vagy hormonálisan végzett előkezelés. Az abszcizinsavas előkezelés stressz-indukciót csökkentő hatását vizsgáltam cirok növényen. Feltételeztük, hogy az előkezelés beindítva a növény védekezési mechanizmusait, stresszfehérjék termelését, felkészíti egy későbbi, erősebb stresszhatás elviselésében.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy a természetes körülményeket jobban modellező, az összetett stressz hatások közti kapcsolatokat és összefüggéseket leíró "cross-talk" elmélet nagyon fontosnak tartja az abiotikus stresszek jeltovábbításában szerepet játszó közös elemeket. Ilyenek pl. a kalmodulin, a CDPK-k és a Ca^{2+} -függő foszfatázok, amelyek fontos kapcsolódási pontokként jönnek szóba a különböző jelátviteli mechanizmusok között.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Környezeti hatások

2.1.1 Stressz és adaptáció

A stressz fogalmát többen is igyekeztek meghatározni, de az élő szervezetekre megfogalmazott általános stressz elmélet Selye János nevéhez fűződik (Selye, 1936). Selye szerint: "A stress egy fajlagos tünetcsoportban megnyilvánuló állapot, mely magában foglal minden nem-fajlagosan előidézett elváltozást egy biológiai rendszeren belül". Az elváltozás fokozott sejtfunkciót és hormontermelést eredményezve ugyan a szervezet védelmét szolgálja, de az adaptációs energiák túlzott igénybevétele károsíthatja az élőlényt. A stresszt kiváltó okot stresszornak nevezzük. "Minden ágens többé-kevésbé stressor is, abban a mértékben, ahogy stress, illetőleg nem-fajlagos elváltozások előidézésére képes." (Selye, 1966). Larcher (1987) szerint a stressz nem egyértelműen káros, ártalmas hatásai mellett elősegíti a növények adaptációs folyamatait és ellenállóképességének kialakulását.

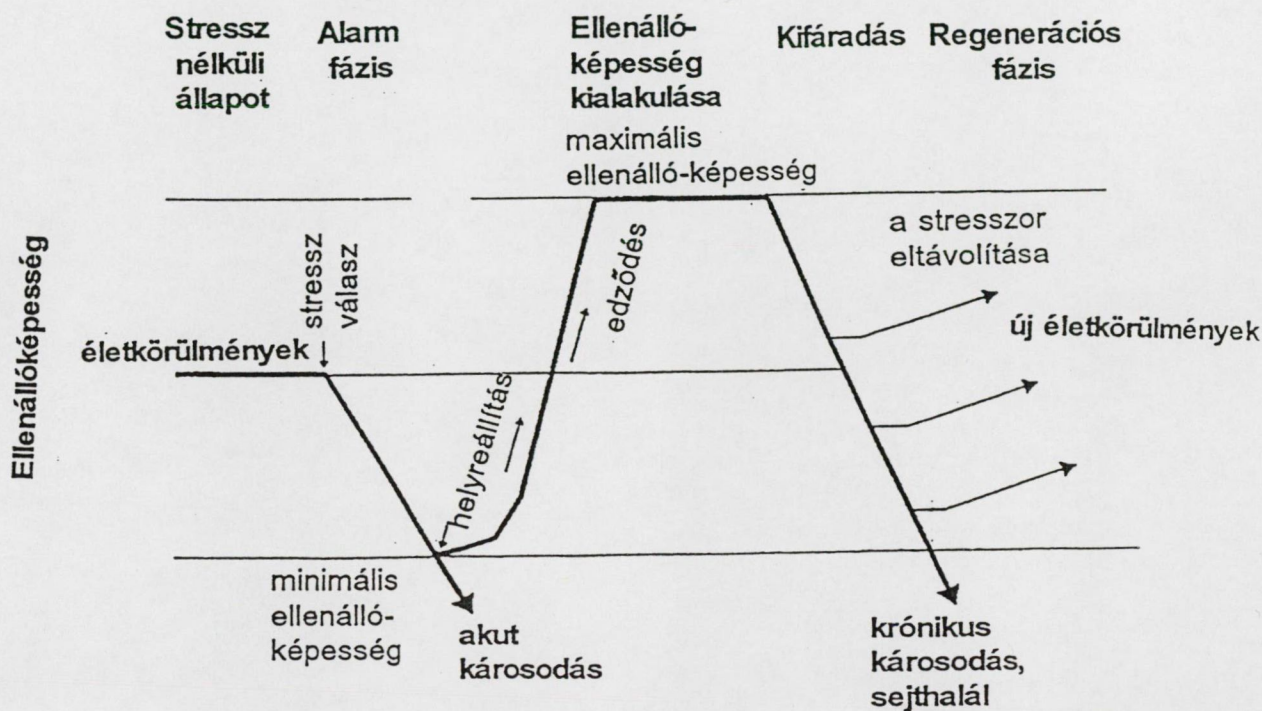
A stressz hatást kiváltó okok csoportosítására Levitt (1980) felosztását használtam. A környezeti stressz tényezőket két nagy csoportba sorolja, biotikus és abiotikus vagy fizikokémiai stresszekre. Az abiotikus stresszt is több környezeti tényező egyedüli vagy együttes megléte válthatja ki. Ezek alapján megkülönböztetünk szélsőséges hőmérsékleti- és vízviszonyok által létrehozott, sugárzások, kémiai anyagok és fizikai behatások okozta stressz típusokat.

Az ősi stressz tényezők (hőmérséklet és vízhiány) ellen az egyszerűbb szervezetek toleranciát fejlesztettek ki, míg a magasabbrendűekre egy fejlettebb rezisztencia forma, az elkerülés a jellemző.

A stressz időbeli lefolyására az emlősökben már jó 65 éve leírt "általános adaptációs szindróma" (GAS) alapelvét alkalmazzuk, miszerint a különböző stressz típusok hasonló adaptációs válaszokat hoznak létre (Selye, 1936). Feltételezték, hogy növényekben is létezik a "GAS" (Leshem és Kuiper, 1996), és a feltételezés igaznak bizonyult, a részleteket Lichtenthaler (1996) dolgozta

ki a Selye-féle alapelveket követve (1. ábra).

Az általános adaptációs szindróma fázisai



1. ábra: Az általános adaptációs szindróma fázisai (Lichtenthaler, 1996). A standard fiziológias körülmények közt növekvő növények stresszválaszainak időbeli lefolyása.

Az alarm fázis a stressz kezdetekor figyelhető meg. Az ellenállóképesség a legalacsonyabb szintre esik vissza, a növényt a csökkent életképesség, a lebontó folyamatok túlsúlya, a normális sejtfunkcióktól való eltérése jellemzi. Ha a stresszor túl erős (túl szélsőségesek a körülmények) az élőlény pusztulása is bekövetkezhet.

Az ellenállóképesség kialakulása vagy a hozzászokás fázisa követi az alarm fázist. Folyamatosan tartó stressz hatás esetén, ha a növény megfelelő

adaptációs képességekkel rendelkezik, akkor megindulnak a stresszel való "együttélést" elősegítő, ún. szintoxikus és a stresszt kiküszöbölő, ún. katatoxikus folyamatok. A növényt adaptációs és repair mechanizmusok, a sejtfunkció helyreállása jellemzi.

A kifáradás túl hosszan tartó stressz esetén következik be. Az adaptációs energiák kimerülnek, a növényre az alarm fázisban leírtak jellemzők, majd a teljes szervezet előregedésével és pusztulásával fejeződik be.

A részleges vagy teljes regeneráció fázisát enyhébb stressz és/vagy megfelelő adaptációs folyamatok esetén figyelhetjük meg. A növény alkalmazkodik a megváltozott életkörülményekhez.

A stresszorokkal szembeni ellenállóképesség megjelenése azt jelzi, hogy a növény képes volt megbírkózni a nemkívánatos környezeti hatásokkal, adaptálódott. A növények ilyen irányú képességét stressztoleranciának nevezzük.

2.1.2 Szárazságstressz

Vízhiányról vagy szárazságstresszről akkor beszélünk, ha a talaj vízpotenciálja tartósan olyan szintre süllyed, amely már károsítja a növény életfolyamatait. A Levitt féle csoportosítást alapul véve a szárazság, só- és UV-B stressz az abiotikus vagy fizikokémiai stresszek közé tartozik. Általánosságban elmondhatjuk, hogy minden stressznek van oxidatív összetevője, amikor a keletkezett reaktív oxigén termékek az antioxidáns védekezőrendszert aktiválják. Az adaptációs válaszok tehát minden esetben érinteni fogják az enzimátikus és nem-enzimátikus védekező mechanizmusokat is. A stressz típusok egyéb szempontból is összefüggnek egymással. Ozmotikus összetevővel többféle stressztípus is rendelkezik, pl. a vízhiány, a sóstressz és a fagy. Közös tulajdonságuk, hogy vízpotenciál csökkenést idéznek elő, de a válaszreakciók a stressz eredetétől függően eltérőek lehetnek.

A vízhiány vagy szárazság különböző erősségű lehet és ez különböző folyamatok leállítását ill. beindulását eredményezi. Enyhe vízpotenciál csökkenéskor (-1 MPa-ig) még csak a sejtmeagnyulás, a sejtfa- és a *de novo* fehérjeszintézis áll le. Erősebb csökkenésre (-2 MPa-ig) már záródnak a

gázcsere nyílások, lecsökken, majd megszűnik a fotoszintézis. Ennél is erőteljesebb csökkenésnél legelőször az abszcizinsav, majd az ozmotikus szabályozás részeként különböző oldott anyagok, ozmotikumok (cukrok, szerves savak, quaterner aminok, betainok) és ionok (főleg K^+ és Na^+) felhalmozódása indul be. Legutoljára az oldott anyagok floémában történő szállítása áll le.

Szárazság károsító hatásai ellen a növények többféle módon védekezhetnek (Turner és Jones, 1980). Egyrészt, igyekeznek elkerülni a szárazságot a vegetációs időszak eltolásával. Másrészt, a külső környezetnél alacsonyabb vízpotenciál létrehozásával továbbra is víz áramolhat a sejtekbe. Ezt leggyakrabban a turgor fenntartásával érik el (ozmotikumok felhalmozása a citoplazmában). Harmadrészt, a magas vízpotenciál fenntartása is jó lehetőség. Ez legegyszerűbben a vízvesztés csökkentésével érhető el, amiben a jó sztómaszabályozás, a vastag kutikula vagy levélfelület csökkentése jelent megoldást. A magas vízpotenciál a vízfelvétel növelésével is elérhető, ami pl. nagy, mélyreható gyökérzet kifejlésztésével valósítható meg.

2.1.3. Sóstressz és sótolerancia

A talaj magas sótartalma, különösen ha ez $NaCl$ formájában jelentkezik, a legfőbb abiotikus stressz a mezőgazdasági növények számára. A Na^+/K^+ háztartás felborulása, enzim inaktiválódás és fehérjeszintézis gátlás, végül csökkent fotoszintézis és növekedés jellemzi az erre érzékeny fajokat, fajtákat. A sóstressz magában foglalja mind az ozmotikus hatásokat (vízpotenciál csökkenés), mind a speciális ionhatásokat (közvetlen membránkárosodások). A só minősége szerint kétféle sóstresszt különböztetünk meg, a magas teljes só koncentráció és magas Na^+ koncentráció miatt létrejövő sóstresszt.

Összetett stressz jellege ellenére a növényekre általánosságban jellemző, hogy képesek adaptálódni a sóstresszhez. A sótolerancia vagy sórezisztencia nem jelent sórezisztens metabolikus folyamatokat, hanem más mechanizmusok játszanak szerepet a károsodás elkerülésében. Különböző stratégiák léteznek az ionkárosodások elkerülésére. A legősibb, a tolerancia kialakítása, azaz a növény egyensúlyba kerül a környezetével, pl. Na^+ -t választ ki a vakuólumba a tonoplaszt

Na^+/H^+ antiporter segítségével. A magasabbrendűekre azonban a károsodás megelőzése a jellemző, azaz nem kerül egyensúlyba a környezetével, hanem a sót, pl. NaCl -t igyekszik kizárni (alacsony membránpermeabilitás klorid ionra) vagy a xilémbe kiválasztani (aktív Na^+/K^+ pumpa), esetleg erőteljes növekedéssel hígulást idéz elő az adott sóra nézve. A növényeket sóstresszre adott válaszuk alapján két csoportba oszthatjuk, sókerülő glükofitákra és sókedvelő halofitákra. A legtöbb gabonanövény (az árpát kivéve), így az általunk vizsgált búza fajták is, glükofiták. Ez azt jelenti, hogy kb. 50 mM NaCl koncentráció felett már károsodnak, de még a sótűrő búza fajták (Kharchia, India) is csak 200 mM NaCl koncentrációit tudnak tolerálni (Erdei és Trivedi, 1989). A második csoportba tartozik pl. a tengerparton élő halofita, az *Aster tripolium* ssp. *tripolium*. Az *Aster tripolium*-ot Nyugat-Európában kedvelt és néhány helyen már termesztett salátanövényként tartják számon, a mi szikes talajainkon előforduló horizontálisan elkülönülő alfaját, az *Aster tripolium* ssp. *pannonicus*-t, sziki őszirózsaként ismerik.

A sóstressz ozmotikus károsító hatása ellen a szerves oldott anyagok citoplazmában történő felhalmozódása a leggyakoribb védekezési mód. A magasabb ozmotikum-tartalommal rendelkező fajok, fajták általában jobb stressztoleranciát mutatnak. Az ionhatások elkerülésére a halofiták a gázcserenyílasok glükofitáktól eltérő szabályozását fejlesztették ki. Az *Aster tripolium* levelein nem találhatók sómirigyek vagy más formában történő sókiválasztás, ezért ha a szövet sótároló kapacitása kimerül, akkor a Na^+ felesleg kijut az apoplastba és a sztómazárósejtek közelében feldúsulva sztómazárást hoz létre (Perera és mtsai, 1994). Ez, a transpiráció csökkentésével és a jobb vízhasznosítással együtt a növény növekedését segíti elő. Korábbi mérések is kimutatták, hogy a külső sókoncentrációval arányosan növekszik egyes sótoleráns fajtákban a hajtás Na^+ felhalmozása és a K^+ vesztese, ezáltal jelentősen megnövekszik a Na^+/K^+ arány (Erdei és Kuiper 1979).

A glükofiták számára a Na^+ valódi veszélyt jelent, hiszen a Ca^{2+} -t helyettesíti a plazmamembránban és ez K^+ effluxhoz, majd a Na^+/K^+ háztartás felborulásához vezet. Ezért, a glükofitáknál kiemelkedően fontos szerepe van azoknak a folyamatoknak, amelyek a sóstressz alatt a sejten belüli Na^+/K^+

ionháztartást szabályozzák. Zhu és munkatársai (1998) bebizonyították, hogy a növények sótoleranciájának kialakításában néhány fehérjének fontos szerepe van a sóstressz által kiváltott jelátviteli folyamatokban. Korábbi munkájuk során néhány sóra nagyon érzékeny, sos (salt overly sensitive) mutánst azonosítottak *Arabidopsis thaliana*-ból. A mutánsokat öt allél csoportba sorolták sos 1- sos 5 -ig, fehérjetermékeik közül a SOS1, SOS2 és SOS3 fehérjét részletesebben vizsgálták.

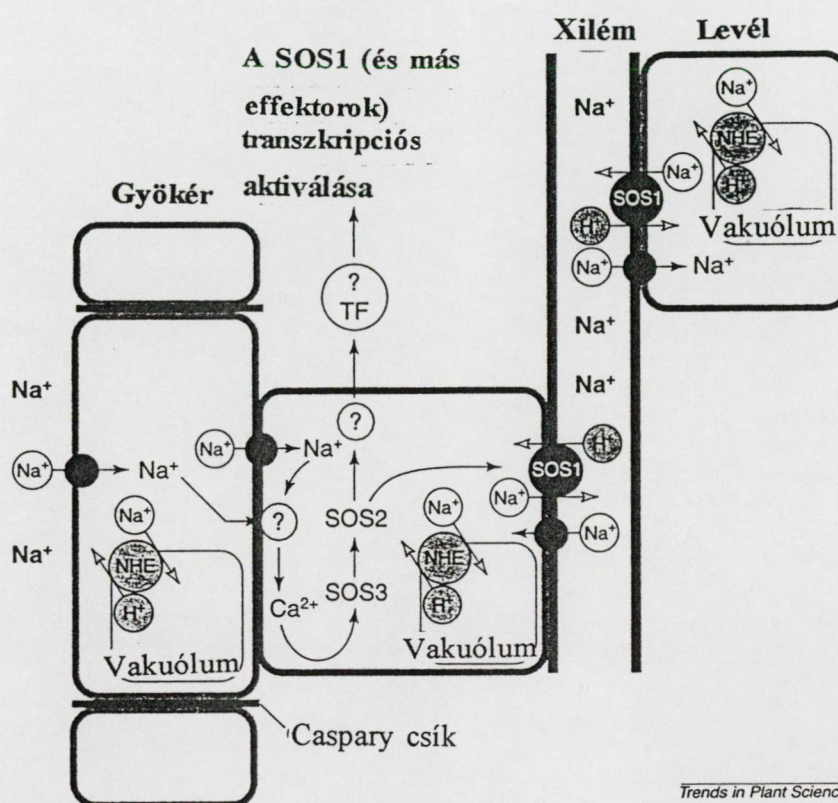
A SOS1 fehérje egy 127 kDa-os feltételezett plazmamembrán Na^+/H^+ antiporter, amely 12 transzmembrán domént tartalmaz az N-terminálison és hosszú hidrofíli citoplazmatikus farkat a C-terminálison (Shi és mtsai, 2000). A SOS1 fehérje legfontosabb szerepe, hogy a gyökér és a levél parenchima sejtekből kipumpálja a Na^+ -t a xilémbe. A xilém nedv a hajtásba szállítja a Na^+ -t, ahol vagy elraktározódik a vakuólumban, vagy a levelek felszínén lévő sómirigyeken keresztül kiválasztódik.

A SOS2 fehérje egy 51 kDa-os szerin/treonin protein kináz, amelynek katalitikus doménje hasonlóságot mutat az emlős AMP-aktivált protein kinázhoz (AMPK) és az élesztő SNF1 (sucrose nonfermenting) kinázhoz. Szabályozó C-terminális doménjének egy része hasonló a CHK1 kinázéhoz, amely a sejtciklus során a DNS kijavításában és az átírásban játszik szerepet. A SOS2 transzkriptum gyökérben és hajtásban is kifejeződik, de gyökérben 200 mM NaCl kezelésre időfüggést mutatva emelkedik a mennyisége, míg hajtásban a kezdeti enyhe emelkedést követően lecsökken. A SOS2 protein kináz csak kalcium és a SOS3 kalcium-kötő fehérje jelenlétében foszforilál, de jelzett ATP jelenlétében viszont autofoszforilációra képes, amit a SOS3 fehérje nem befolyásol (Liu és mtsai, 2000). A 2. ábrán a SOS fehérjecsalád SOS1, SOS2 és SOS3 elemeit és a sótolerancia folyamatában játszott szerepüket láthatjuk.

A SOS3 egy kalcium-kötő 2C típusú szerin/treonin protein foszfatáz, három EF-hand típusú kötőhellyel. Az élesztő calcineurinjának B alegységével és az állati agyban lévő kalcium érzékelőkkel (NCS) mutat hasonlóságot. Az újabban az AtCBL (*Arabidopsis* calcineurin B-like) fehérjecsalád tagjaként említik, mint AtCBL4-t. A vizsgálatok arra utalnak, hogy a SOS3 fehérje szükséges a SOS2 protein kináz aktiválásához. Az AtCBL fehérjék által aktivált protein kinázok, a

CIPK (az AtCBL1 aktiválja) és a SIPK (az AtCBL4 aktiválja) egy új alosztályát képviselik a protein kinázoknak. Ezeket CIPK/SIP protein kinázoknak nevezik és a SNF1/AMPK családdal mutat rokonságot, de nem azok növényi megfelelői.

Az SOS mechanizmus modellje



Trends in Plant Science

2. ábra: A SOS (salt overly sensitive) mechanizmus modellje és szerepe a sótolerancia kialakulásában (Hasegawa és mtsai, 2000, Epstein, 1998).

TF: transzkripció faktor, NHE: tonoplaszt Na⁺/H⁺ antiporter, fekete nyíl: Na⁺ mozgás, fehér nyíl: antiporter

Liu és munkatársai (2000) bebizonyították, hogy a sótolerancia és a Na⁺/K⁺ homeosztázis létrehozásában lényeges szerepe van a fehérje foszforilációnak. A SOS1 Na⁺/H⁺ antiporter aktiválását valószínűleg, a SOS2 protein kináz végzi, foszforilálva a fehérjét, hasonlóan az emlős NHE (tonoplaszt Na⁺/H⁺)

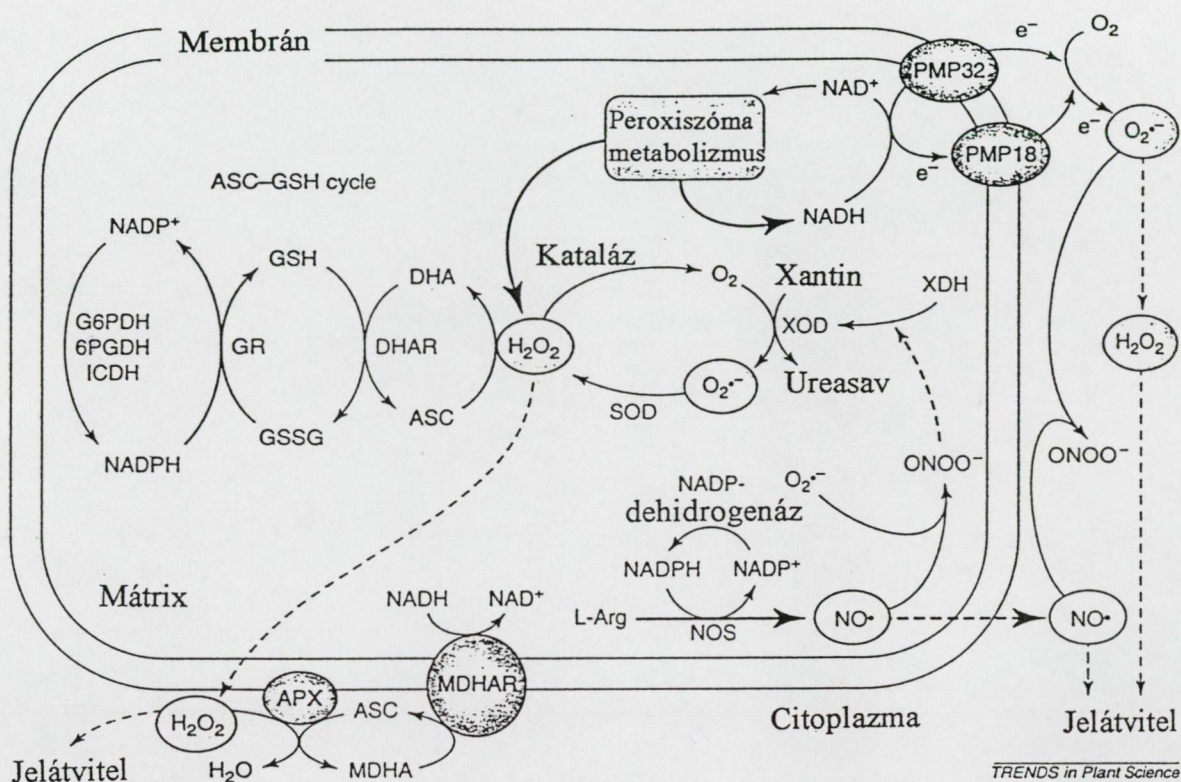
antiporterhez. Az aktivált SOS2 protein kináz ezenkívül olyan transzkripciósfaktorokat is foszforilál, amelyek a *sos1* génnek átíródását segítik elő (2. ábra). Az ionháztartás két szinten (transzkripció és poszt-transzláció) történő szabályozása először egy gyors stressz választ, majd tartós növekedést tesz lehetővé az emelkedett külső Na^+ koncentráció mellett is.

2.1.4 UV-B stressz

Az ultraibolya sugárzás ($\lambda=10 - 400 \text{ nm}$) egyrészét, a 280 nm-nél rövidebb hullámhosszúságút (UV-C), a Föld légköre szinte teljesen elnyeli, így az nem befolyásolja a felszínen élő növények és állatok életfolyamatait. Az UV sugárzás fennmaradó részét két tartományra oszthatjuk, UV-B (280 - 315 nm) és UV-A (315 - 400 nm) sugárzásokra. A légköri ózon réteg elvékonyodása miatt főleg a felszínre érkező UV-B sugárzás jelent egyre nagyobb veszélyt az élőlényekre. Az ózon réteg csökkenését és a lyukak létrejöttét többféle okra vezetik vissza. A legelfogadottabb, a klórozott szénfluoridok, valamint a nitrogén-, klór- és bróm-oxidok katalitikus reakciójából származó károsodás (Molina és mtsai, 1996). Kísérletek igazolják, hogy az UV-B sugárzás következtében csökken a biomassza, a pollen csírázási %-a, károsodik a magképzés. Ezeket a hatásokat a DNS, a fotoszintetikus apparátus, a membránok és fehérjék károsodása, a hormonok inaktiválódása okozza.

A sugárzás, mint oxidatív stressz hatására a növényi sejtekben igen reaktív oxigén termékek pl. szuperoxid anionok (O_2^-), hidroxil gyökök (OH^\cdot), hidrogén peroxid (H_2O_2), alkoxi gyökök (RO^\cdot) keletkeznek, ezek elsősorban az antioxidáns védekezőrendszert aktiválják, amely enzimatis és nem-enzimatis elemekből áll. Normál fízológias körülmények között a peroxiszómák enzimrendszere (SOD, kataláz, GR, APX) közömbösíti a káros gyököket, de UV-B besugárzás hatására csökken a kataláz szintézise, ami fokozott gyökképződéshez vezet (Krizek és mtsai, 1993). Számos közlemény leírja, hogy alacsony koncentrációban bizonyos gyökök (NO^\cdot , O_2^-) és a H_2O_2 jelátvivő molekulaként viselkednek a patogének elleni védekezésben (Van Camp és mtsai,

Jelátvivő molekulák képződése a peroxiszómában



3. ábra: Jelátvivő molekulák (NO•, H₂O₂, O₂•⁻) képződésének modellje a peroxiszómában (Corpas és mtsai, 2001).

SOD: szuperoxid dizmutáz, XOD: xantinoxidáz, XDH: xantin dehidrogenáz, APX: aszkorbinsav peroxidáz, MDHAR: monodehidroaszkorbinsav reduktáz, GR: glutathion reduktáz, NOS: nitrogénoxid szintáz, G6PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 6PGDH: 6-foszfoglukonát dehidrogenáz, ICDH: izocitrát dehidrogenáz, ASC: redukált aszkorbinsav, DHA: dehidroaszkorbinsav, DHAR: dehidroaszkorbinsav reduktáz, GSH: redukált glutathion, GSSG: oxidált glutathion, MDHA: monodehidroaszkorbinsav.

Barabás és munkatársai (1998) búza csíranövényeken vizsgálták az UV-B stressz antioxidáns enzimatis rendszer elemeire (SOD, kataláz) tett hatását a növény stressz válaszainak alarm és adaptációs fázisait nyomon követve. Az enzimaktivitás-változások jelentős eltérést mutatnak a két fázis között. Az UV-B sugárzás elleni védelem egyik lehetősége, hogy emelkedik az UV sugárzást abszorbeáló fenol-származékok, mint pl. a flavonoidok és a hidroxifahéjsav észterek mennyisége (Landry és mtsai, 1995). A fenol-származékok szintéziséért felelős enzimek transzkripcióját a MYB fehérjék befolyásolják. A MYB fehérjék pozitív és negatív szabályozó szerepet is betöltő transzkripciós faktorok (Hemm és mtsai, 2001). Az UV-B sugárzás hatására a fehérjeszintézisben bekövetkező sokféle változás feltételezi a protein kinázok szerepét a jelátviteli folyamatokban.

2.2 Jelátviteli folyamatok

2.2.1 A kalcium-közvetített jelátvitel néhány jellemzője

A növényeket természetes körülmények között számos hatás éri a külső környezet részéről. Ezeket jeleknek tekinthetjük, amelyek nagyrészt a növény érzékeli és válaszreakciót alakít ki. A jelérzékelésre azonban nem minden sejt képes, csak amelyek megfelelő receptorokkal rendelkeznek az adott jelre, többnyire a sejtmembrán felszínén vagy a citoplazmában. A növényi sejt felszíni receptorok gyakran katalitikus aktivitással rendelkeznek és az állati tirozinkinázokhoz hasonlóak foszforilálnak, de nem a tirozinon, hanem a fehérjék szerin/treonin oldalláncán. Több típusuk ismert és általában leucinban gazdag ismétlődő szekvenciát hordoznak. Meg kell említeni azt a két-komponensű jelátviteli rendszert, amelynek fontos szerepe van a növekedésszabályozók és a környezeti stressz érzékelésénél. Lényeges lépése a foszforilálás áthelyezése az egyik típusú jelátvivő molekuláról a másikkra egy hisztidin kináz közreműködésével (Urao és mtsai, 2000).

A jelérzékelés fontos lépése a jel továbbítása és felerősítése hírvivőmolekulák segítségével. Ilyenek például a G-fehérjék, a polifoszfoinozitok,

a cGMP, a hormonok és növekedésszabályozók és a kalcium. A jel továbbítása többféle útvonalon lehetséges, amely mindig a jel specifitásától, a receptor biokémiai természetétől és a válaszreakció típusától függ.

A kalcium azonban nem csak hírvivőként fontos, hanem mint a környezeti hatásra jellemző, egyedi kalcium-jelet létrehozó molekula. Jelenleg, a kalcium-jel kialakításának kétféle elméletét ismerjük. Az egyik a 'kalcium aláírás' elmélet, amely szerint a specifikus kalcium-jelet meghatározza a citoplazmában létrejövő átmeneti és tartós kalcium-szint mintázat pontos kinetikája, erőssége és a kalcium forrása. A másik a 'nagyság x idő elmélet', amely szerint a kalcium-szint emelkedésnek magának vagy a teljes növekedésnek (nagyság x idő) el kell érnie egy minimális küszöbértéket.

A kalcium-jel továbbítása döntő fontosságú a jelátvitelben, mivel a kalcium ion alacsony diffúzibilitással rendelkezik. A jel egy jól meghatározott helyről ered és végül az egész sejtre átkerül. A jel terjedése jellegzetes mintázatokat vehet fel, lehet tüskeszerű, hullámszerű, lecsengő, szimmetrikus vagy aszimmetrikus oszcilláció. Különböző környezeti hatásokra más és más átmeneti és tartós mintázatok jönnek létre. A kalcium-jel hullámszerű vagy oszcilláló terjedését növényekben az utóbbi években írták le sztóma zárósejteket tanulmányozva (McAinsh és mtsai, 1995, Trewavas, 1999a). A hullámszerű terjedés főleg a tartós mintázatok változatosságát növeli, mivel lassan halad a koncentráció-változás és a sejten belüli, IP_3 -közvetített kalcium-felszabadulásra jellemző. Az oszcillációt az átmeneti változásokra írták le, ebben az esetben gyorsabban halad a jel, amelyet a sejten kívüli kalcium-szint befolyásol. Természetes környezetben a növényt általában többféle környezeti hatás éri, így a mintázatok teljesen egyedi keveréke jöhet létre (Knight és mtsai, 1998).

A citoplazmatikus kalcium-jel kialakításához szükséges kalcium mennyiség egyes környezeti hatásokra (pl. vízstressz, gibberelinsavas kezelés, elicitor hatások) a sejten kívüli térből, az apoplaszból jut a sejt belsejébe. Más hatásoknál (pl. citokinin és abszcizinsav által közvetített válaszoknál), a sejten belüli tárolókból, főként a vakuólumból kerül ki a kalcium (Gilroy, 1996). Sok esetben azonban mindkét helyről történik kalcium kiáramlás, mint pl. a hideg stressz okozta változásoknál, ahol egy jellegzetes kétfázisos mintázatot

figyelhetünk meg, a kezdeti átmeneti nagy kalcium-szint emelkedést az apoplaszt biztosítja, míg a később megjelenő kisebb és elhúzódó koncentráció változást az IP_3 -közvetített kalcium csatornák nyitása a belső tárolókon (Knight és mtsai, 1996). Az összetett stressz hatások összefüggéseit figyelembe vevő "cross-talk" elmélet a kalcium-szabályozott effektor fehérjéknek, a kalmodulinnak, a protein foszfatázoknak és a protein kinázoknak kitüntetett szerepet tulajdonít a kalcium-jel terjedésében (Knight és Knight, 2001).

A kalcium-kötő fehérjék, közül a legismertebb és a legtöbbet tanulmányozott, a kalmodulin. Ez a kis molekulású, 148 aminosavból álló, hőstabil fehérje mind az állati, mind a növényi kalcium-jel továbbításában fontos szerepet tölt be. A kalcium kötődése a két globuláris fehérje doménen, 2-2 egyenértékű kötőhelyen, kölcsönhatáson alapulva történik (Linse és mtsai, 1991). A kalmodulin egy erősen konzervált, többfunkciós enzim. Kalmodulin szabályozza többek között a miozin könnyű lánc kinázt, a foszforiláz kinázt, kalcium/kalmodulin-függő protein kinázt, a kalcineurin foszfatázt, a Ca^{2+} -ATPázokat, a glutamát dekarboxilázt, a glioxalázt, egyes hősokk fehérjéket és transzkripciós faktorokat. A növényi és állati eredetű cDNS szekvenciákat összehasonlítva nagyfokú homológiát tapasztalunk. Ezek alapján feltételezhető, hogy a növényi és az állati rendszerekben hasonlóan zajlanak le a kalcium/kalmodulin-közvetített jelátviteli folyamatok. Amíg azonban az állatokból izolált kalmodulin egy izoformában létezik, az eddig vizsgált növényekben számos izoformáját azonosították. A fehérjét több gén kódolja, kifejeződésük specifikus szövetre, fejlődési állapotra (Takezawa és mtsai, 1995). Valószínűleg különböző környezeti ingerekre nem csak a kalcium-jel mutat változatosságot, hanem a kalmodulinnak is különböző izoformái kerülhetnek előtérbe, növelve a jel sokféleségét és specifitását. Van der Luit és munkatársai (1999) megfigyelték, hogy a szél és hideg hatásra bekövetkező sejten belüli kalcium-szint emelkedés a *cam-1* transzkriptumának felhalmozódását idézi elő transzgénikus dohány növényekben. Általában a kalmodulin-közvetített jelátvitelnek a hideg-, oxidatív- és mechanikai-stresszek esetén van szerepe. A kalcium/kalmodulin komplex többféle fehérjének, többnyire kinázoknak és foszfatázoknak lehet a szubsztrátja.

A kalcium-kötő fehérjék újabb családját alkotják a sóstressz és

sótolerancia áttekintésénél már említett AtCBL fehérjék, amelyek valójában 2C típusú szerin/treonin protein foszfatázok. A fehérjecsalád nyolc tagját azonosították, amelyek három EF-hand típusú kalcium kötőhelyet tartalmaznak, de stressz-indukciót eddig még csak két fehérjénél tapasztaltak. Az AtCBL4 vagy SOS3 kalcium-kötő fehérjénél, amelyet a sóstressz indukál és az AtCBL1 fehérjénél, amelynek génje szárazság-, hideg- és sebzés-indukált. Megfigyelték, hogy a különböző izoformák más-más protein kinázzal lépnek kapcsolatba (Kim és mtsai, 2000). Az alfalfa sejtek 2A típusú foszfatázainak inaktiválódása is kalcium-szabályozott, a folyamatot eddig hideg-indukáltnak vélték, de feltételezik, hogy más stressz típusok is hatással vannak rá.

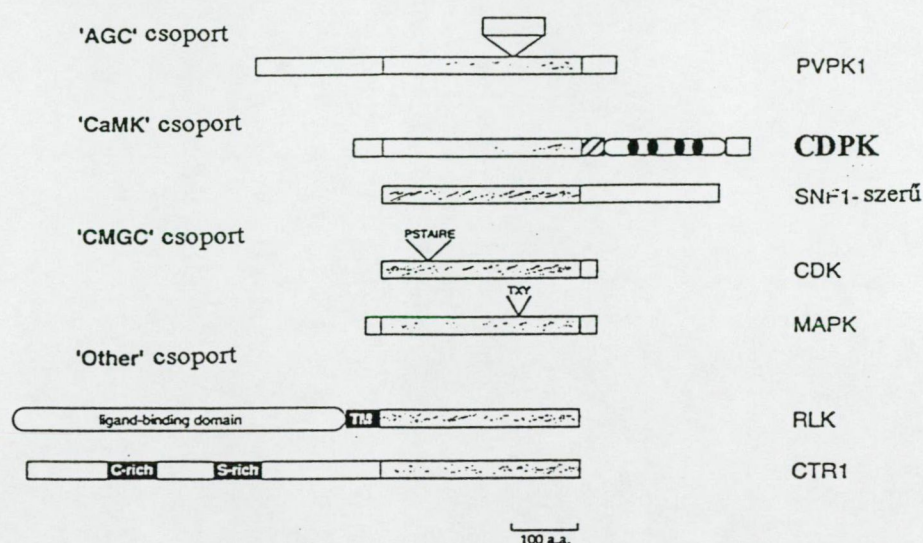
A kalcium-kötő fehérjék közé tartoznak még a kalcium-függő protein kinázok, amelyek egyes típusait a fent említett két kalcium-kötő fehérje is aktiválhatja. A jel felerősítése, megsokszorozása és gyakran a génexpresszió is különböző fehérjék foszforiláltsági állapotának megváltozásával hozható összefüggésbe, ezért különösen fontos a növényi protein kinázokról szerzett ismeretek összefoglalása és bővítése.

2.2.2 CDPK típusok

Az eukarióta protein kinázokat katalitikus (kináz) doménjük hasonlóságai alapján öt csoportba osztották (Hanks és Hunter, 1995). Az ötből négy csoportba besorolhatók a növényi protein kinázok (4. ábra).

A jelátvitelben részt vevő sokféle protein kináz közül azokat, amelyek kalcium függőségük és fehérjeszerkezetük hasonlósága alapján egy nagy családba tartoznak, kalmodulin-szerű domént tartalmazó protein kinázoknak (CDPKs) nevezzük. A CDPK a SNF1-szerű (sucrose nonfermenting) kinázokkal együtt a 'CaMK' (calmodulin-binding protein kinase) csoportba tartozik (Stone és Walker, 1995). A CDPK-k jellegzetesen növényi protein kinázok, bár néhány egysejtűben és zöldalgában is megtalálhatók, állatokban eddig még nem írtak le homológ enzimeket.

A növényi protein kinázok csoportosítása



4. ábra: A növényi protein kinázok nagyobb családjai a Hanks és Hunter (1995) csoportosítása szerint.

'AGC' csoport: ciklikus nukleotid-függő kinázok (protein kináz A, G) és kalcium-foszfolipid-függő kinázok (protein kináz C),

'CaMK' csoport: kalmodulin-kötő protein kinázok, CDPK: kalmodulin-szerű domént tartalmazó kinázok, SNF1-szerű: SNF1/AMP-aktivált kinázok,

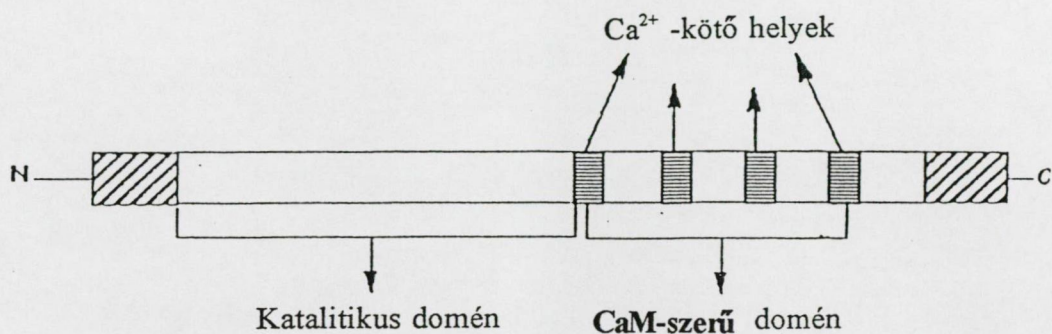
'CMGC' csoport: a ciklin-függő kinázok (CDK), a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK), a glikogén szintáz kinázok (GSK-3) és a kazein kináz II (CKII),

'Other' csoport: receptor-szerű kinázok (RLK) és a citokinin receptor 1 (CTR1).

A növényi CDPK-k általános szerkezetére jellemző, hogy három funkcionális fehérjerésszel rendelkeznek: egy katalitikus-, egy kapcsoló- és egy kalcium-kötő résszel (5. ábra). Az N-terminális rész katalitikus doménje hasonlóságot mutat a szerin/treonin protein kinázok katalitikus doménjével. A C-terminális domén a CDPK típusoknak megfelelően változatos szerkezetet mutat, többnyire 3-4 EF-hand típusú kalcium kötőhelyet tartalmaz. A harmadik funkcionális domén, a kapcsoló rész, az enzim aktivitásának szabályozását végzi egy gátló, 30 aminosavat tartalmazó fehérje-rész segítségével, amit autoinhibitornak vagy pszeudo-szubsztrát inhibitornak is neveznek. Kalcium jelenlétében olyan szerkezet-változás jön létre a kapcsoló doménben, ami a

gátlás feloldását eredményezi és így egy enzimatikusan aktív szerkezet alakul ki. Kalmodulin-függő enzimek esetében kalmodulin-kötő helyként is szolgál a kapcsoló rész.

A CDPK sematikus ábrázolása



5. ábra: Egy tipikus kalcium-függő/kalmodulin-független protein kináz (CDPK) sematikus ábrázolása (Sopory és Munshi, 1998)

A CDPK nagycsalád négy típusát különböztetjük meg (Harmon és mtsai, 2000) (6. ábra).

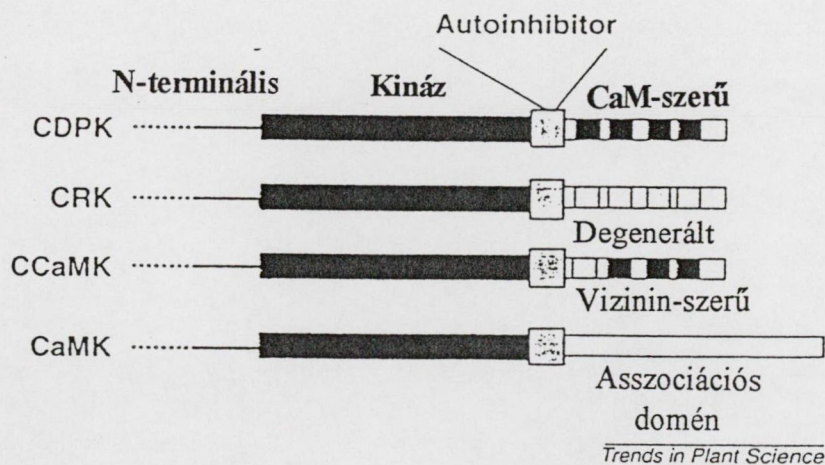
- A kalcium-függő, kalmodulin-független protein kinázokat (CDPK) először Harmon és munkatársai (1987) írták le, molekuláris jellemzése Harper és munkatársai (1991) nevéhez fűződik. Ekkor derült fény arra, hogy egyes kalcium-függő protein kinázok miért nem igényelnek kalmodulint aktiválásukhoz. Egyrészt, az autoinhibitor domén kalmodulin-kötő szekvenciája molekulán belüli kölcsönhatásba lép a holoenzim kalmodulin-szerű doménjével, így képtelen lesz a kalmodulin megkötésére. Másrészt, a C-terminális szabályozó doménje kb. 40 %-os szekvencia-homológiát mutat a kalmodulinnal, 4 kalcium kötő fehérjerészt (EF-hand-et) tartalmaz, ami elegendő a kalcium megkötéséhez és az enzim aktiválásához.

- A CDPK-kapcsolt protein kináz (CRK) kalcium- és kalmodulin-független kináz, azaz *in vitro* szerin/treonin foszforilációhoz nincs szüksége sem kalciumra, sem kalmodulinra. Valójában rendelkezik egy lehetséges kalmodulin kötőhellyel az

autoinhibitor doménen, mégis a legtöbb izoformánál hatástalan a hozzáadott kalmodulin. Ezt szerkezete is igazolja, kb. 20 %-os szekvencia azonosságot mutat a kalmodulinnal, de a kalcium kötőhelyek (EF-hand-ek) degeneráltak. Katalitikus doménje nagyon hasonló a kalcium-függő kinázokéhoz. Számos izoformáját kimutatták már, de keveset tudunk szabályozásáról és fiziológiás szerepéről (Farmer és Choi, 1999).

- A kalcium/kalmodulin-függő protein kináz (CaMK) kalcium-kötő doménje nagyfokú hasonlóságot mutat az állati agyból izolált CaMKII kalmodulin-kötő fehérjerészeivel. Kalcium-kötő (EF-hand) fehérjerészeket nem találunk a C-terminális doménen, a kalmodulin kötését az autoinhibitor régió végzi. Növényekben, egy kivételtől eltekintve, nem általános a megléte (Watillon és mtsai, 1995).

CDPK típusok



6. ábra: A CDPK és három rokon protein kináz domén szerkezete (Harmon és mtsai, 2000). CDPK: kalmodulin-szerű domén protein kináz, CRK: CDPK-rokon protein kináz, CCaMK: kiméra kalcium/kalmodulin-függő protein kináz, CaMK: kalcium/kalmodulin-függő protein kináz, CaM-szerű: kalmodulinhoz hasonló kalcium-kötő domén.

- A kiméra kalcium/kalmodulin-függő protein kináz (CCaMK) két szabályozó doménnel rendelkezik, az egyik a kalmodulin-kötő domén az autoinhibitor régióban, a másik a vizinin-szerű (egy másik EF-hand típusú fehérje) kalcium-kötő domén három kalcium- és egy biotin-kötő hellyel. Az enzim kalcium és kalcium/kalmodulin jelenlétében is aktiválható. A kalcium serkenti az autofoszforylációt, viszont gátolja az *in vitro* szubsztrát foszforylációt. Ezzel ellentétben a kalcium/kalmodulin komplex gátolja az autofoszforylációt és serkenti a szubsztrát foszforylációját. Néhány növényi szövetben kimutatták, de nem elterjedt a növényvilágban (Poovaiah és mtsai, 1999).

2.2.3 A CDPK néhány jellemzője és stressz-indukciója

A CDPK-k főbb biokémiai jellemzői közt kalcium- és kalmodulin-függését és szabályozását említhetjük. Mikromólos koncentrációjú kalcium körülbelül 40-100-szoros aktivitás-emelkedést hoz létre a CDPK működésében, ami egyértelműen az enzim kalcium-függőségét jelenti (Nakamura és mtsai, 1995). Általában, a külsőleg adott kalmodulin és lipid a CDPK aktivitását nem befolyásolja. Tehát, az enzim kalmodulin függetlennek mondható, ennek ellenére a kalmodulin antagonistá trifluoperazin dózis-függően gátolja a szubsztrát foszforylációját (Battey és Venis, 1988). Molekulásúlyuk elég változatos, 52 és 90 kDa között találjuk.

Aktivitását gátolja néhány speciális anyag (lantanidák, kalmidazólium) és számos polipeptid (aktin, gramicidin, hisztin H_4). Számos növényi másodlagos metabolit gátló hatást fejt ki a jelátvitelben is szerepet játszó protein kinázokra, a PKC-re, a MLCK-ra, a cAK-ra és a CDPK-ra. A búza embrióból izolált CDPK és más protein kinázok aktivitását is hatékonyan gátolják azok a vízdékonny tanninok, amelyek öt fenol-csoportot tartalmaznak (Polya és mtsai, 1995). A tanninok, a ligninekhez hasonlóan a növényi sejtfal vázalkotó polimerjeit képezik, elsősorban kémiai védőanyagok a növényevők és az UV-sugárzás ellen. Erősen redukáló hatásúak, komplexeket alkotnak a fehérjékkel, egyéb makromolekulákkal, ásványi anyagokkal. Komplexbépző tulajdonságuk miatt kisebb koncentrációban kedvezőek a kérődzők emésztésére, az antioxidáns

védekezőrendszert segítik, antikarcinogének. Nagy koncentrációban toxikusak, tumorkeltők, de a legtöbb növényfajban olyan alacsony mennyiségben fordulnak elő, hogy inkább a pozitív hatásuk érvényesül. Az ember szervezete főként a zöld és fekete tea, valamint vörös bor fogyasztásakor jut tanninokhoz és más fenol-karbonsavakhoz. A fenol-karbonsavak a tanninok prekursorai ill. lebontási termékei közé tartoznak, képviselőjük az ellagsav, amely fás növényekben, zöldegekben és gyümölcsökben fordul elő. Számos kedvező és gyógyászati szempontból igen fontos hatását írták le, többek között antioxidáns, rák megelőző hatású, gyökfogó, vérnyomáscsökkentő és nyugtató.

A CDPK-k foszforilálnak sejten belüli szubsztrátokat is (hiszton H-1, α -amiláz gátló, foszfolipid transzfer fehérjék, kalmodulin antagonisták, nitrát reduktáz stb.) és sejten kívülieket is (kazein, hiszton III S, hiszton H-1, hiszton H-2B) szerin és treonin oldalláncokon (Oláh és mtsai, 1989, Polya és mtsai, 1989). Az általam is használt syntide-2 szintetikus oligopeptidet (PLARTLS`VAGLPGKK) a szerin oldalláncon foszforilálja.

A kalcium-függő protein kináz autofoszforilációs képességét már 1987-ben leírták Harmon és munkatársai, miszerint a szójából izolált CDPK a hiszton III. szubsztrát mellett az enzim saját szerin és treonin oldalláncait is képes foszforilálni. Mind a natív, mind a rekombináns CDPK rendelkezik ezzel a képességével, bár az autofoszforiláció pontos helye és szerepe nem ismert, néhány CDPK izoformában azonban kimutattak lehetséges autofoszforilációs helyeket (Lys-Gln-Phe-Ser) az autoinhibitor doménben. Az emlős agyban megtalálható kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II (CDPKII) autofoszforilálása aktív enzimet eredményez, amely már nem igényel további kalcium/kalmodulin komplexet. Feltételezik, hogy a növényi CDPK család is ilyen mechanizmus szerint működik (Bögre és mtsai, 1988, Harmon és mtsai, 2000). A kinázok a sejten belül több helyen is megtalálhatók, a citoplazmában (Oláh és mtsai, 1989, DasGupta, 1994), membránhoz, többnyire plazmamembránhoz kötötten, (Nakamura és mtsai, 1995) ill. a sejtmagban (Polya és mtsai, 1983).

A CDPK-k hatásukat foszforilációs/defoszforilációs lépéseken keresztül, többnyire a transzkripció faktorok foszforiláltsági állapotát, DNS-kötő képességüket befolyásolva fejtik ki (Sheen, 1996, Jupin és Chua, 1996, Liu és

mtsai, 2000). A CDPK kifejeződését az emelkedett kalcium-szinten keresztül számos tényező, főleg környezeti stressz hatások befolyásolják. A stressz-indukciót és néhány jellemzőjét a SNF1-szerű protein kinázokban, a CDPK-ban és más protein kinázokban is kimutatták. Az SNF1-szerű protein kinázok az élesztő, *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 (sucrose non-fermenting) szerin/treonin protein kinázához hasonlóak. Növényi SNF1-szerű protein kinázt kódol a búza embrióból izolált *PKABA1* gén, amelynek transzkriptuma már 0,1 μ M exogén ABS és 12 órás dehidratálásra indukálódik (Anderberg és Walker-Simmons, 1992, Gómez-Cadenas és mtsai, 1999). Az SNF1-szerű protein kinázokhoz tartozik még az *A. thaliana*-ból izolált sóstressz-indukált SOS2 gén terméke, amely a plazmamembrán Na^+/H^+ antiportert aktiválva a felesleges Na^+ -t a xilémbe pumpálva, elősegíti a megfelelő növekedést sós körülmények között. A sóstressz-indukált protein kináz gének közt meg kell említeni a tarackbúzából, *Lophopyrum elongatum*-ból izolált *Esi47*-t (early salt stress inducible), amelynek génterméke 6 órán át tartó 250 mM NaCl-os kezelés hatására indukálódik egy 49,38 kDa-os szerin/treonin protein kináz formájában (Shen és mtsai, 2001). *Arabidopsis thaliana*-ból szárazság- és sóstressz-indukált CDPK gént is izoláltak (Urao és mtsai, 1994). Az *ATCDPK1* és *ATCDPK2* gének mRNS-szintje a stressz hatásra gyorsan emelkedett és ABS-től függetlennek bizonyult.

2.3 Az abszcizinsav szerepe a stresszválaszokban

2.3.1 Az abszcizinsav általános jellemzői

Az abszcizinsavat 1953-ban még mint "növekedésgátló anyag"-ot írták le, majd a '60-as évek elején több növényfajból olyan új növekedésszabályozó anyagokat izoláltak, amelyek kémiai szerkezetük alapján azonosnak bizonyultak és abszcizinsavnak nevezték el. Ez a növényi hormon minden kloro- vagy amiloplasztot tartalmazó sejtben termelődik. Kémiai szerkezete alapján a szeszkviterpénekhez tartozik, bioszintézise a karotinoid bioszintézist is magába foglalja, direkt úton (mevalonsavból) vagy indirekt úton (izopentenil-pirofoszfátból)

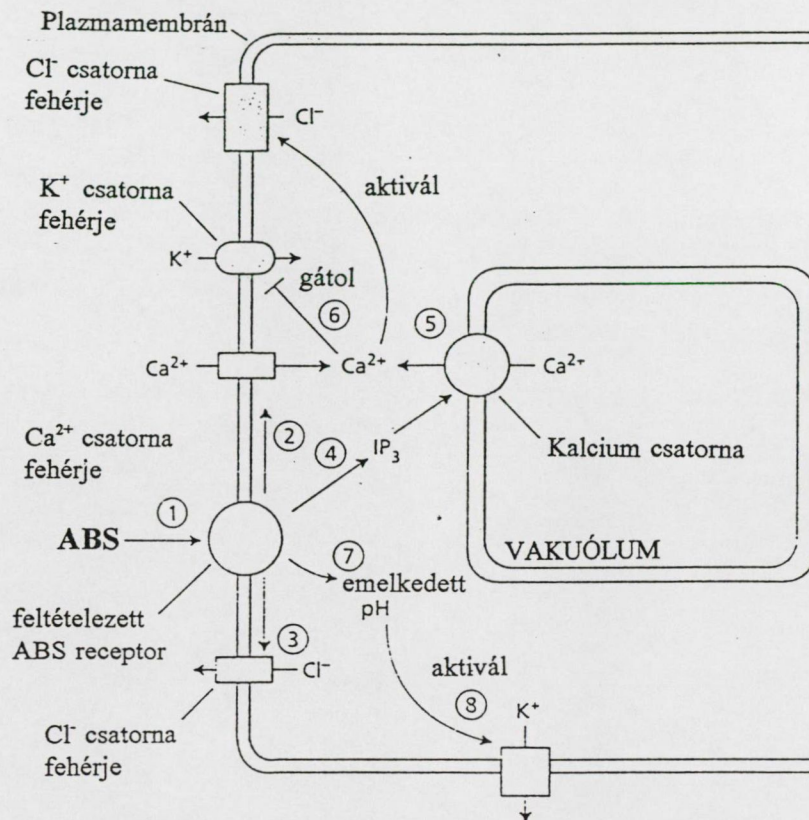
képződhet. A bioszintézis utak részleteinek igazolásában az ABS hiányos mutánsok (ABS bioszintézis valamely lépésében gátoltak, pl. *viviparus*, *aba*, *flacca*, *droopy* mutánsok) nagy segítséget jelentettek. Az abszcizinsavtartalom fejlődés közben (pl. magvak, termések érése) és környezeti hatásokra (pl. vízhiány, só- és fagystressz) ugrásszerűen megnő. A koncentráció-változás forrásai többek között a levélben vagy gyökérben létrejövő bioszintézis növekedése, az ABS újraelosztása a mezofill sejtekben és a gyökerekből történő transzport. A vízhiány megszűnése az ellentétes irányú folyamatokat indítja be, a bioszintézis csökkenését, az abszcizinsav lebontását és a levelekből történő kijutását.

Fiziológiai hatásait tekintve a legfontosabb szerepe a magvak és rügyek nyugalmi állapotának kialakításában és megszüntetésében van. Erre utal az is, hogy bár igen kis mennyiségben fordul elő a magasabbrendű növényekben, a legtöbb abszcizinsavat a fejlődő magvak és az érő termések tartalmazzák. Ezenkívül etiléntől függetlenül elősegíti a levélöregedést és közvetve növeli az etilénképződést, ezáltal serkenti a levélleválást, az abszcissziót. Az abszcizinsav stresszhormonként betöltött szerepe igen fontos, többek között a gázcserenyílások zárásával javítja a növény vízhasznosítását szárazság idején.

2.3.2 Az abszcizinsav szerepe a stresszválaszokban

Az általános adaptációs szindróma tanulmányozásánál Davies és Zhang (1991) megfigyelték, hogy száradó földben, még a levelekben mérhető vízállapot megváltozása előtt növekszik a gyökerek endogén abszcizinsav tartalma (helyi adaptációs szindróma). A hormon-szint ingadozásra különösen a sztómazárósejtek érzékenyek, emelkedett ABS-tartalomra a sztómák bezárásával válaszolnak. A kezdeti gyors zárásért a leveleken belüli abszcizinsav újraelosztása a felelős. A száradás folytatódása esetén az abszcizinsav a gyökérből szállítódik a hajtásba. Az ABS hatásmechanizmusát a 7. ábra mutatja.

Az abszcizinsav hatásmechanizmusának modellje



7. ábra: Az ABA hatásmechanizmusának modellje a sztómazárósejtben (Blatt és Thiel, 1993).

Az abszcizinsav hatásmechanizmusának kezdeti lépése a legtöbb hormonhoz hasonlóan, a plazmamembránban található receptorhoz való kötődés (1). Az abszcizinsav disszociációjából származó protonok beáramlása átmeneti membrándepolarizációt hoz létre, ami a plazmamembrán kalcium influx csatornáinak megnyitásával külső kalcium beáramlását teszi lehetővé az apoplasztból (2), másrészt a feszültség-függő lassú (S-típusú) anion efflux csatornák kinyílnak, így nagy mennyiségű klorid és malát ion áramlik ki a sejtéből turgorcsökkenést hozva létre (3) (Pei és mtsai, 1997). Emellett kalcium-függő jelátviteli úton, az IP_3 segítségével a sejtben belüli raktárakból pl. vakuolumból történő kalcium felszabadulással is növekszik a sejtben belüli kalcium-szint (4,5)

(Gilroy, 1996). A gázcserenyílások zárása az ABS-val kiváltott kalcium-szint emelkedéssel előidézhető. A plazmamembrán tartós depolarizáltságának hatására feszültség-függő K^+ efflux csatornák kinyílnak (8). A citoplazmatikus kalcium-szint és az ezzel összefüggő pH emelkedés (7) ugyanakkor erősen gátolja a K^+ influx csatornákat és a H^+ -ATPázokat (6). Az utóbbi években kimutatták, hogy az IP_3 mellett a ciklikus ADP-ribóz is jelátvivő molekulaként viselkedik, elősegíti a kalcium felszabadulását a vakuólumból, a hideg- és szárazság-indukált ABS-közvetített útvonalon (Allen és mtsai, 1995). A vízhiányra indukálódó gének elválaszthatatlanok az ABS-ra indukálódó génektől. Mindkét hatásra nagyon hasonló fehérje mintázatbeli változást figyeltek meg. Három olyan transzkriptum (pLE4, pLE16, pLE25) felhalmozódását írták le, amelyeket vízhiánnyal indukáltak, ABS által szabályozottak és kifejeződésük az endogén ABS tartalommal összefüggésben van. A vízhiányra-indukálódó gének egy része a stressz körülményektől függetlenül is kifejeződik a magok érési, kiszáradási szakaszában. A magfejlődés 2. szakaszának kései fázisában halmozódnak fel ezek a fehérjék, innen az elnevezés "late embryogenesis abundant" vagy LEA-fehérjék. A LEA-fehérjék hat csoportba oszthatók, homológok, bázikusak, erősen hidrofil tulajdonságának és random tekercses szerkezetének köszönhetően ion- és vízmegkötő képességével a membránok szerkezetét védi és megakadályozza a fontos fehérjék kristályosodását (Bray, 1993). A LEA-fehérjék 1-es csoportjához tartozó Em fehérje (búza) génjét a vízhiány, a magas ozmotikum, a NaCl és az ABS indukálja. Az Em promóterrel végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a megfelelő indukcióhoz egy 62 bp hosszúságú szabályozó szakasz (G-box), az ún. ABRE (ABA responsive element) szükséges, valamint egy enhancer (A/T) szakasz biztosítja az expresszió magas szintjét. A G-boxhoz kötődő fehérje a bZIP (basic leucin zipper) transzkripció faktorokkal mutat hasonlóságot (Guiltinan és mtsai, 1990). Egyes CDPK-ok (*AtCDPK1* és *AtCDPK1a*) aktiválják azokat a transzkripció faktorokat, amelyek felismerik az ABRE szekvenciát különböző gének promóter szakaszában (Sheen, 1996). Az ABS-indukált gének (pl. *Em*, *rab*) szabályozása kalcium- és kalmodulin-független jelátviteli úton történik. Az ABS negatív szabályozóként hat a fotoszintézissel kapcsolatos génekre (*cab*, *rbcS*) és a gibberelinsav-indukált α -amiláz (*AMY*) génexpresszióra.

A gátlás ugyanakkor kalcium- és kalmodulin-függő módon zajlik le. A kalcium-függő és -független jelátvitel az ABS válaszok egymástól független szabályozását teszi lehetővé.

Környezeti stressz hatásokra számtalan fehérje szintézise indul meg, amelyek indukcióját exogén abszcizinsav kezeléssel is kiválthatjuk (Mäntylä és mtsai, 1995). Holappa és Walker-Simmons (1995) kísérletei azt igazolják, hogy az abszcizinsavval indukált változásokat környezeti stresszel is kiválthatjuk. Az abszcizinsav-indukált protein kináz mRNS-ének (PKABA1) jelentős felhalmozódását figyelték meg dehidratálást követően 2 órán belül, míg hideg, ozmotikus stressz és magas NaCl koncentráció hatására 24 órán belül.

Az exogén ABS hatására létrejött stresszfehérje felhalmozás felhasználható az ABS előkezeléssel létrehozott stressztolerancia kiváltásának tanulmányozására. Korábbi eredmények igazolják az abszcizinsavval történő előkezelésszárazságstressz-toleranciátelősegítő, védőhatását cirokban (Traore, 1988, Bartels és mtsai, 1990). Amzallag és munkatársai (1990) szintén cirokban külsőleg adott abszcizinsavval növelték a sóstressz adaptációt, ami jól kimutatható volt ionháztartással és a növekedéssel kapcsolatos vizsgálatoknál. Erdei és Taleisnik (1993) eredményei is azt igazolják, hogy 3 napos 200 mOsm-os PEG 6000 és NaCl kezelésnél különbségek láthatók a kukorica és a kenyércirok növekedési görbéi, ion felhalmozása és vízmegtartó tulajdonságai között. Az indiai kenyércirok jó szárazság- és sótűrő fajtaként ismert, sóstressz alatt vízdékony szerves anyagokat halmoz fel az ozmotikus egyensúly fenntartásához. A cirok növekedését a stressz hatások és az abszcizinsav (0,1 μ M) kevéssé befolyásolták, viszont javult az ionháztartása, lényeges K^+ - felhalmozódás volt megfigyelhető. A kukorica sóstressz károsodásánál az ABS jelentős védő szerepet töltött be.

3. Célkitűzések

Korábbi eredményeink igazolták, hogy stressz körülmények között eltérő fiziológiai válaszreakciók mutathatók ki a kukorica és a cirok között (Nagy és mtsai, 1995). A környezeti jel továbbításában, a stresszválaszok létrejöttében fontos szerepet játszik egy jellegzetesen növényi protein kináz, a kalcium-függő, de kalmodulin-független protein kináz (CDPK). A CDPK autofoszforilációs aktivitás változásait és exogén szubsztrát foszforilálását kalcium jelenlétében vizsgáltuk. Kísérleteinkben nem-ionos ozmotikus (PEG), só (NaCl) és UV-B kezelés hatására bekövetkező CDPK-indukció változását mértem különböző stressz érzékenységű gabonanövényekben (búza, kukorica és kenyércirok), valamint egy sókedvelő halofita növényen, az *Aster tripolium*-on. A cirok és a búza különösen alkalmasnak bizonyult a CDPK néhány általános jellemzőjének és a stressz indukciónak a megfigyelésére.

Céljaink közt szerepelt:

- a, A CDPK néhány általános biokémiai jellemzőjének azonosítása, a kináz kalcium- és kalmodulin-függőségének vizsgálata autofoszforilációs képessége alapján, valamint gátlásuk EGTA-val, ill. trifluoperazinnal. Foszforilálási aktivitásának mérése exogén szubsztrát jelenlétében és annak gátlása másodlagos metabolitokkal.
- b, A CDPK stressz-indukcióját nyomonkövetése ozmotikus-, só- (NaCl) és UV-B kezelések során. Az indukció vizsgálatát több növényi rendszeren, főként gabonanövényeken tervezzük.
- c, Az esetleges CDPK stressz-indukciónak a jellemzése. Mérjük a stresszor koncentrációjától és a kezelési idő hosszától függő aktivitás-változást ozmotikus- és sókezelés esetében.
- d, Feltételezzük, hogy az abszcizinsavas előkezelés védő, stressz-csökkentő hatása a CDPK aktivitás-változásában is kimutatható.
- e, Összehasonlítjuk, hogy a különböző stressz toleranciával rendelkező növényfajok, -fajták között van-e a CDPK-indukció mintázatában különbség.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Növénynevelés és kezelések

4.1.1. Növénynevelés

Az ozmotikus stresszhez kapcsolódó mérésekhez mérsékelten szárazságtűrő kukorica vonalat (*Zea mays* L. cv. Pioneer 3950) és szárazságtűrő kenyércirok vonalat (*Sorghum bicolor* L. Moench cv. ICSV. 112, Hyderabad, India) használtunk (Masojidek és mtsai, 1991). A csíranövényeket vízkultúrásan neveltük módosított Hoagland tápoldatban (Erdei és mtsai, 1984) Convicon PGW 36 típusú klímakamrában 23/18°C hőmérsékleten, 90 %-os relatív páratartalom mellett és 13/11 órás fényperiódusban. A megvilágítás 60 Wm^{-2} volt a hajtások szintjén Sylvania F48/T12/CW/VHO és Gro-Lux WS F48/T12/GRO/VHO/WS típusú fénycsöveket használva.

A NaCl-os kezeléseket a szárazságtűrő "Tiszatáj" és szárazságra érzékeny "Kata" búza csíranövényeken (*Triticum aestivum* L. cv. GK-Tiszatáj és GK-Kata, Gabonakutató Intézet, Szeged) végeztük. Az UV-B kezeléshez csak a "Tiszatáj" vonalat használtuk, a CDPK enzimaktivitás mérésekhez pedig a *Triticum aestivum* L. cv. Mv-8 (Gabonakutató Intézet, Szeged) fajtából vettünk mintát. A búza nevelése azonos módon történt a ciroknál és a kukoricánál leírtakhoz, azzal a különbséggel, hogy UV-B besugárzásnál a magoncok egyik fele a kontrollként szolgáló klíma kamrában nőtt a már ismert fényviszonyok közt, míg a másik fele egy olyan kamrában nevelkedett, amelyet UV-B sugárzást is kibocsátó fénycsövekkel szereltünk fel.

A NaCl-os kezelés hatását egy tengerparton élő sókedvelő növényen, az *Aster tripolium* ssp. *tripolium*-on tanulmányoztuk. Nyugat-Európában kellemes sós íze és magas fehérjetartalma miatt kedvelt és néhány helyen már termesztett zöldségnövény. A magokat (Ellewoutsdijk LAAG ökotípus, Brüsszel, Belgium) perlitbe ültettük és a csírázás, majd a magoncokká nevelés időtartama alatt módosított Hoagland tápoldattal öntöztük. Körülbelül 22 nap után vízkultúrába helyeztük, majd a kiültetés utáni 14. nap különböző NaCl koncentrációjú

sókezelést végeztünk.

4.1.2. Kezelések

Ozmotikus kezelés:

A nem-ionos ozmotikus kezelés cirok és kukorica esetében a kiültetés 8. napján kezdődött (Amzallag és mtsai., 1990) és PEG 6000-rel (M_r 6000-7500) történt. Az alkalmazott koncentráció 0, 100 és 200 mOsm ($\text{kg H}_2\text{O}$)⁻¹ PEG 6000, amit a tápoldatba mértünk be. A kezelési időtartama 3 nap, 2 óra ill. az időfüggés tanulmányozásakor 0, 15, 30, 60 és 120 perc volt. A koncentrációk kiválasztása előzetes mérési eredményekből adódott (Szabó-Nagy és mtsai, 1992, Erdei és Taleisnik, 1993).

Búzánál (Kata és Tiszatáj) az ozmotikus kezelés a kiültetés 12. napján kezdődött és 0, 100, 200 és 300 mOsm koncentrációjú PEG 6000 oldattal 1, 7 és 72 óráig tartott. Az ozmolaritás mérése és a kívánt érték beállítása ozmométerrel történt (Micro GMK, Szeged), kalibrációs görbe alapján.

NaCl-os kezelés:

A sóstressz létrehozásához NaCl-os kezelést alkalmaztunk búza (Kata és Tiszatáj) és a halofita *Aster tripolium* csíranövényeken. A búza növényeket a csírázástól számított 12. napon 0, 50, 100 és 150 mM NaCl-t tartalmazó tápoldatba helyeztük 3 napig, amelyek ozmolaritása megegyezik a 100, 200 és 300 mOsm PEG-lal. A halofita *Aster tripolium* növényeket a kiültetés utáni 14. nap helyezettük át 0, 2, 10 és 300 mM NaCl koncentrációjú tápoldatba és egy hónapos kezelés után vettünk mintát az autofoszforilációs mérésekhez.

UV-B kezelés:

Az UV-B kezelés olyan Philips típusú (TL 100W/01) fénycsővekkel történt, amelyek jellemzője, hogy a kibocsátott, $2,5 \text{ Wm}^{-2}$ erősségű sugárzás nagyrésze a 310-315 nm hullámhossz tartományba esik ($\lambda_{\text{max}}=311/312 \text{ nm}$) (Santos és mtsai, 1993). A búza csíranövényeken (Tiszatáj) végzett kezelés a kiültetéstől számított 11 napig tartott. Mintákat a 4., 5., 6., 7., 8. és 11. napon vettünk.

Abszcizinsavas kezelés:

Az abszcizinsav stresszt kivédő hatásának vizsgálatára a 3 napos PEG kezelés előtt 3 napos 0,1 μM -os ABS előkezelést hajtottunk végre cirok gyökereken. Az ozmotikus stressz alatt az előkezeléssel megegyező koncentrációban adagoltuk az abszcizinsavat a Hoagland tápoldatot tartalmazó edényekbe. A mérési eredményeket 4 független nevelésből kaptuk.

4.2 Citoplazmatikus fehérjék kivonása

Az aktivitás méréshez használt búza csíranövényeket 14 napos korban ill. a kezelés befejeztével dolgoztuk fel. A mintavételnél egyenlő mennyiségű (1-2 g) hajtást és gyökeret mértünk le és háromszoros térfogatú homogenizáló pufferrel homogenizáltuk. A homogenizáló puffer összetétele: 250 mM szacharóz, 5 mM EDTA, 0,2 % (w/v) polivinil-polipirrolidon (PVPP) és 50 mM Tris-MES puffer (pH 7,5). A homogenizátum szűrletét Sorvall RC-5B centrifugával centrifugáltuk, 20 percig 18000 g fordulaton, majd a különböző membrán részecskék (plazmalemma, tonoplaszt) eltávolítására a felülúszót 60 percig 25000 g fordulaton ismét centrifugáltuk. Minden műveletet + 4 °C-on végeztünk. A mintákat felhasználásig - 70 °C-on tároltuk.

4.3 Fehérjetartalom mérés

Az összfehérje meghatározását Lowry és mtsai (1951) módszerével végeztük és BSA-ból készült (marha szérum albumin) kalibrációs koncentráció sor (0-200 μg) segítségével határoztuk meg a kivonatok fehérjetartalmát. Egy kezelésből legalább 5 növényből vettünk mintát és három párhuzamos fehérjemérést végeztünk.

4.4 Fehérjék radioaktív jelölése

A mintákat felhasználás előtt felolvasztottuk és 25 mM Tris-MES (pH 7,5) pufferrel 1 mg/ml fehérjekoncentrációt állítottunk be, majd 10 percig

szobahőmérsékleten inkubáltuk. A foszforilációhoz használt reakcióelegy összetétele a következő volt: 10 mM MgCl_2 , 100 μM CaCl_2 , 25 mM Tris-MES pufferben (pH 7,5), 20 μg fehérje kivonat (Oláh és Kiss, 1986) és 1 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (spec. akt.: 110 PBq mol^{-1} , 37 kBq mintánként, Szegedi Biológiai Központ Izotóp Intézete). A kontroll mintában a Ca^{2+} megkötését 2 mM EGTA hozzáadásával értük el. Az enzim kalmodulin-függőségét 100 μM CaCl_2 és 10 μM kalmodulin jelenlétében mutattam ki, valamint a kalmodulin speciális gátlószerének, a trifluoperazinnak a hatását is vizsgáltam 0,5 mM és 1 mM végkoncentrációban, szintén 100 μM CaCl_2 -dal együtt. A reakciót a radioaktívan jelzett ATP bejuttatásával indítottam és szobahőmérsékleten 3 percig inkubáltam a reakcióeleggyel. A foszforilációt 10 μl 5x-ös töménységű SDS mintapufferrel állítottuk le. A mintapuffer összetétele a következő: 0,6 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (w/v) SDS, 5 % 2- β -merkaptoetanol, 10 % glicerin, 1 mg/ml brómfenolkék.

Ezután a mintákat 1 percig forraltam kb. 90 °C-on, majd elektroforetikus szétválasztásra használtuk.

4.5 Jelölt fehérjék kimutatása

A jelölt fehérjéket SDS - PAGE -sel, a standard módszer szerint (Laemmli, 1970) választottuk szét, 3 %-os gyűjtőgél és 11 %-os elválasztógél használva. Zsebenként 40 μl mintát vittem fel és gélenként 12 - 15 mA áramerősséggel futtattam. A molekulasúlyt jelző fehérjék az alacsony (14,4 - 94 kDa, Pharmacia) molekulasúly tartományba tartoztak. Az elektroforézis után a géleket Coomassie brilliant blue R festéssel megfestettük, majd szárítás után exponáltuk a röntgenfilmeket (Kodak-XAR-5) - 70 °C -on, intenzitásnövelő betéteket használva, 3-5 napig. Az expozíció után előhívtuk a filmeket, amelyeken a jelölt foszfor fehérjébe történő beépülését sötét foltok jelezték. Az autoradiogramokat (ZX Spectrum mikrokomputerrel összekapcsolt) lézer denzitométerrel és a Pollák Tamás (1986) által készített GelScan program segítségével értékeltük ki. Az esetek nagy részében egy reprezentatív mintát választottunk az eredmények bemutatásához, mivel a feketedések abszolút értéke futtatásonként jelentősen eltérhetett. A diagramok egy részében

kezelt/kontroll aránypárokat használtunk. Standard deviációt az ismert képlet alapján számoltunk az autoradiogramok kiértékelésének adataiból .

4.6 CDPK aktivitás mérés

A kalcium-függő protein kináz aktivitás méréséhez a következő reakcióelegyet állítottam össze:

10 mM MgCl_2 (Mg^{2+} - ATP a foszfát donor),

100 μM CaCl_2 ,

20 μM syntide -2 (szintetikus oligopeptid -PLARTLS`VAGLPGKK - a CDPK szubsztrátjaként használatos, SZOTE Orvosi Vegytani Intézet, Szeged, (Hashimoto és Soderling ,1987)),

10 μg fehérje kivonat,

25 mM Tris-MES inkubáló puffer (pH = 7,5)

A kontroll mintáknál a kalcium megkötésére 2 mM EGTA került még a reakcióelegybe, az CDPK indukciójára pedig kalcium/kalmodulin komplex (100 μM /10 μM).

A CDPK foszforilációs aktivitásának gátlására tanninsavat (0,1 , 1, 5 és 10 μM) és ellagsavat (0,1 , 1, 10, 50 és 100 μM) adtunk a reakcióelegybe.

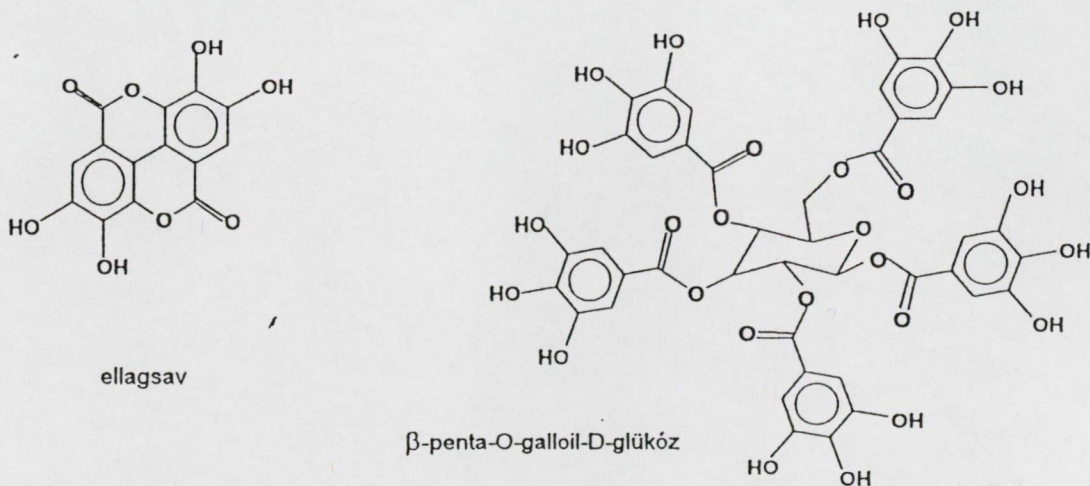
A reakció elindítása mintánként 1 μM [γ - ^{32}P] ATP (spec. akt.: 110 PBq mol^{-1} , 37 kBq) hozzáadásával történt és 1 percig inkubáltuk + 4 °C-on. A foszforilációs reakciót 10 μl 100 % TCA-val állítottuk le és a reakcióelegyet közvetlenül foszfocellulóz papírra pipettáztuk (Whatman 3T-31), hogy a jelölt és kicsapódott fehérjék a papírhoz kötődjenek. Ezután a nem kötődött fehérjét lemostuk, háromszor öblítettük 10 %-os TCA-val. A papírkorongokat dioxános szcintillációs koktélt tartalmazó küvettákba tettük és a jelölt foszfát syntide-2 szubsztrátba történő beépülését folyadék szcintillációs mérővel követtük nyomon.

4.7 A tanninok és az ellagsav

A tanninokat nem lehet pontos kémiai szerkezettel leírni, mert bármely eléggé nagy molekulatömegű fenolos vegyület ide tartozhat, ha elegendő fenolos hidroxil csoportot vagy más alkalmas csoportot (pl. karboxil csoport) tartalmaz ahhoz, hogy erős komplexet alkosson a fehérjékkel vagy más makromolekulákkal (pl. keményítő, cellulóz), ill. ásványi anyagokkal. A komplexképzés főleg H-hidakon keresztül valósul meg, de hidrofób és kovalens kötések is létrejöhetnek a negatívan töltött fenol-karbonsavak és a fehérjék pozitívan töltött, protonált aminocsoportjai között. A tanninokat két osztályba sorolhatjuk, a kondenzált és a hidrolizálható vagy vízdékony tanninok. A komplexképzés legerősebb a hidrolizálható tanninok esetében. Valószínűleg a gátló hatás nem csak a hidroxil csoportok számától, hanem térbeli helyzetüktől is függ. A tanninok modell vegyülete a tanninsav (β -penta-O-galloil-D-glükóz), a 8. ábrán látható. A hidrolizált tannin molekulasúlya $M_s = 1700.2$.

Az ellagsav a fenol-karbonsavak közé tartozik, szerkezete szintén a 8. ábrán látható.

A tanninsav és az ellagsav kémiai szerkezete



8. ábra: Az ellagsav és a tanninsav (β -penta-O-galloil-D-glükóz) kémiai szerkezete.

4.8 Atomabszorpciós mérések

Az előkészített minták K^+ , Na^+ tartalmának meghatározása Hitachi Z 8200 típusú polarizált Zeeman atomabszorpciós spektrofotométerrel történt.

4.9 Felhasznált anyagok

A kalmodulin, a bis-akrilamid, a tannin és az ellagsav a SIGMA-tól, az akrilamid a SERVA-tól, a PEG 6000 a Fluka cégtől, a molekulasúly kalibrációs készlet a Pharmacia-tól került beszerzésre. Az $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP a Szegedi Biológiai Központ Izotóp Intézetében készült. A többi vegyszer a Reanal Vegyészeti Rt. terméke.

5. Eredmények összefoglalása

5.1 A CDPK néhány biokémiai jellemzője

5.1.1 Általános jellemzők

A növényi CDPK részleges biokémiai jellemzésére és a különböző stressz hatások tanulmányozását több növényen végeztük. Egy mérsékelten szárazságtűrő kukorica fajtát, egy jó szárazságtűrő cirok fajtát és egy kevésbé szárazságtűrő búza fajtát, valamint egy sókedvelő halofita növényt, az *Aster tripolium*-ot használtuk.

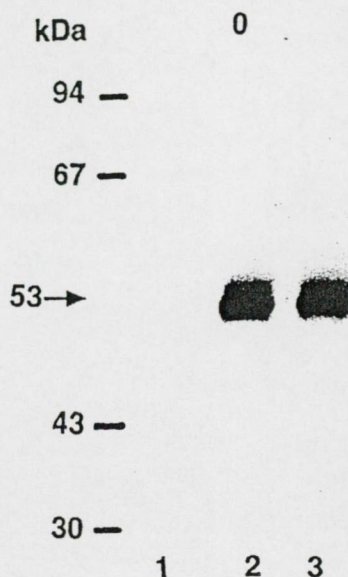
Az általam vizsgált kalcium-függő protein kináz autofoszforylációs képességét már 1987-ben Harmon és mtsai leírták, miszerint a szójából izolált CDPK a hiszton III. szubsztrát mellett az enzim saját szerin és treonin oldalláncait is foszforylálta. Kísérleteimben igazolták a kináz autofoszforylációs képességeit, hiszen hozzáadott endogén és exogén szubsztrát nélkül is foszforylációs jelet adott a radiogrammon. A jel csak hozzáadott kalcium (100 μM) vagy kalcium/kalmodulin (100 μM /10 μM) jelenlétében volt kimutatható (8. ábra). Kalcium-mentes környezetben, a reakcióelegyben jelenlévő 2 mM EGTA hatására, az autofoszforylációs jelet nem vagy alig tudtuk kimutatni.

A CDPK autofoszforylációs jeleit a leggyakrabban az 52-53 kDa-os molekulatömeg tartományban (cirok), de néhány esetben a 49 kDa-nál és UV-B stressz esetében 65 kDa-nál figyelhetjük meg (9. ábra).

Elhelyezkedés szempontjából a CDPK a citoplazmában, a membránokban (többnyire a plazmamembránban) és a sejtmagban fordul elő. A differenciál centrifugálással eltávolítjuk a plazmamembrán és a tonoplaszt membrándarabkákat, így a vizsgált protein kináz feltehetően citoplazmatikus eredetű.

A CDPK család kalcium érzékenysége az irodalmi adatok szerint változatos, növényfajok és fajon, fajtán belüli izoformák szerint is eltérő. Kísérletileg meghatározott kalcium-kötő sajátságok csak néhány CDPK-ról ismertek, a szekvenciaanalízisek nem minden esetben adnak pontos információt.

A CDPK kalcium-indukciója és molekulásúlya

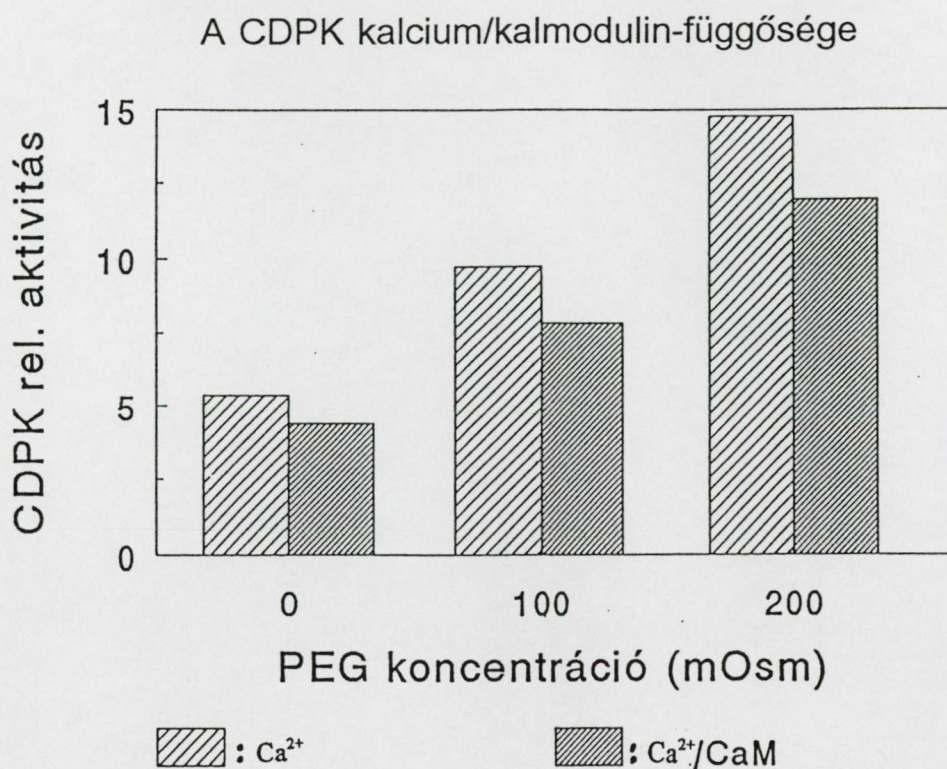


9. ábra: Kezeletlen citrok gyökér autoradiogramja. A jel az 53 kDa-os molekulásúly tartománynál látható.

1: - Ca^{2+} , 2: + Ca^{2+} , 3: + Ca^{2+} / kalmodulin.

Kísérleteimben az autofoszforilációs jel megjelenéséhez $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 a reakcióelegyben a legtöbb esetben elegendő volt. A szabad kalcium megkötésével (2 mM EGTA) az autofoszforilációs jel gyengén vagy egyáltalán nem mérhető (9. ábra).

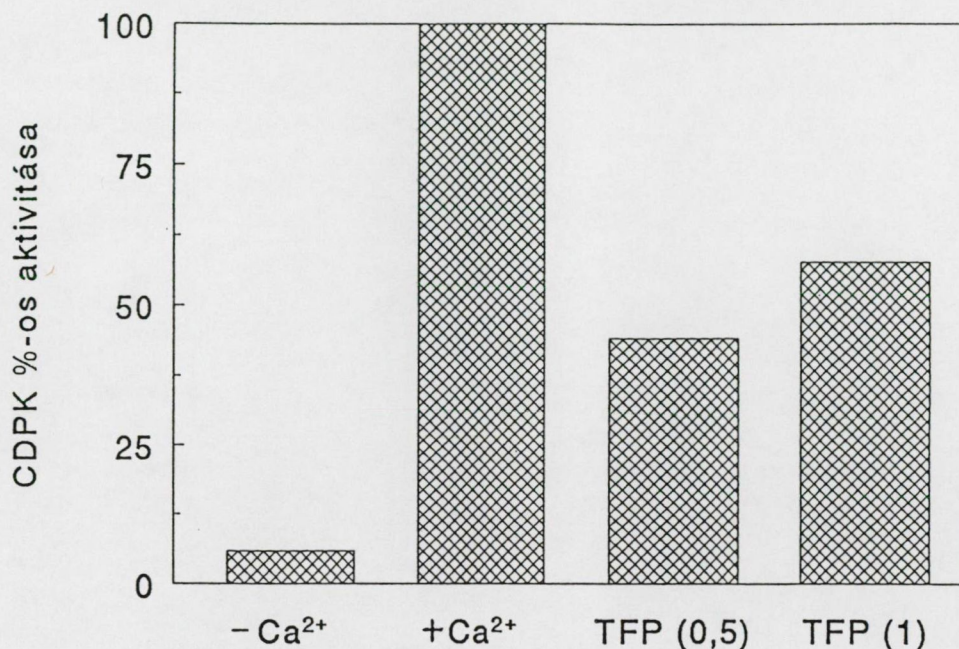
A CDPK kalmodulin-függőségének vizsgálatára kalcium/kalmodulin komplexxel ($100 \mu\text{M}$ CaCl_2 és $10 \mu\text{M}$ kalmodulin) aktiváltam az enzimet. Eredményeink azt bizonyították, hogy kalmodulintól függetlenül is hasonló, sőt átlagosan 20 %-kal ($18,5 \% \pm 1,5$) erősebb autofoszforilációs jelet kapunk ha csak kalciumot adunk a reakcióelegyhez (10. ábra). A CDPK relatív aktivitásán a $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 jelenlétében autoradiográfiásan mért jel erősségét értettük.



10. ábra: Kalcium/kalmodulin-komplex hatása a PEG-indukált CDPK relatív aktivitására cirok gyökérben.

Irodalmi adatok szerint a külsőleg adott kalmodulin nem befolyásolja a CDPK aktivitását jelentősen, de a kalmodulin antagonistá trifuoperazinnal koncentráció-függő módon szubsztrát foszforiláció gátlást érhetünk el (11. ábra). Kísérleteinkben, kezeletlen cirok gyökérkivonat CDPK autofoszforilációs aktivitását mértük *in vitro* kalcium nélkül (2 mM EGTA) és kalcium jelenlétében (100 μM CaCl_2), valamint gátlószerként 0,5 ill. 1 mM trifuoperazint alkalmaztunk 100 μM CaCl_2 -dal együtt. Kalcium jelenlétében közel egy nagyságrenddel megnőtt a jel. Az így létrehozott aktivitás növekedést 100 %-nak tekintve a 0,5 és 1 mM trifuoperazin hatására körülbelül a felére csökkent a kináz autofoszforilációs jele.

A kalmodulin antagonistista TFP hatása a CDPK aktivitására



11. ábra: A CDPK %-os aktivitása Ca²⁺ jelenlétében és anélkül, valamint a TFP gátló hatása Ca²⁺ cirok gyökérben.

- Ca²⁺: 2 mM EGTA, + Ca²⁺: 100 μ M CaCl₂,

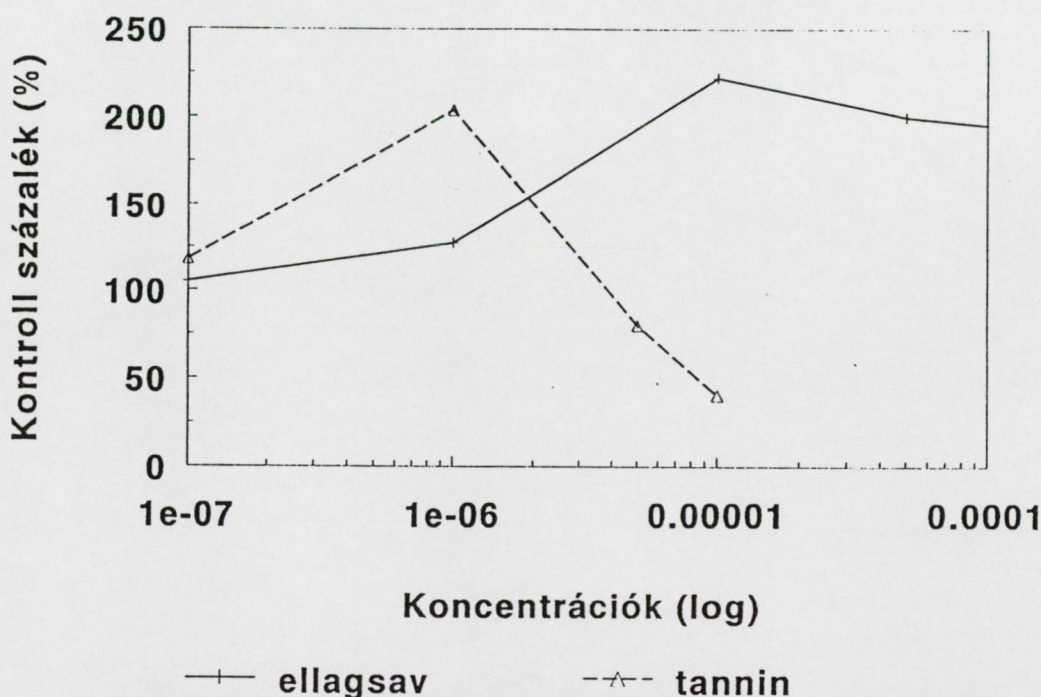
TFP (0,5): 0,5 mM TFP Ca²⁺jelenlétében, TFP (1): 1 mM TFP Ca²⁺jelenlétében,

5.1.2 Aktivitás mérések, exogén szubsztrát foszforilálása és gátlása

A növényi CDPK tulajdonsága közt említett exogén szubsztrát foszforilációt syntide-2 szintetikus oligopeptiddel végeztem. Kísérleteimben búza (Mv-8) gyökér kivonatát használva a tanninsav és ellagsav gátló hatását vizsgáltam *in vitro*, tanninsav esetében 0,1, 1, 5 és 10 μ M, míg ellagsav esetében 0,1, 1, 10, 50 és 100 μ M koncentrációkat alkalmaztunk (12. ábra). Az autofoszforilációs eredmények nem mutatták ki sem a tanninsav, sem az ellagsav gátlását a CDPK-n. Az exogén szubsztrát (syntide-2) foszforilálásának aktivitását azonban befolyásolták. Az enzim aktivitás változását folyadék szcintillációs módszerrel

követtem nyomon, kalcium és kalcium/kalmodulin komplex jelenlétében, három párhuzamos minta mérésével.

Tannin és ellagsav hatása a CDPK aktivitására



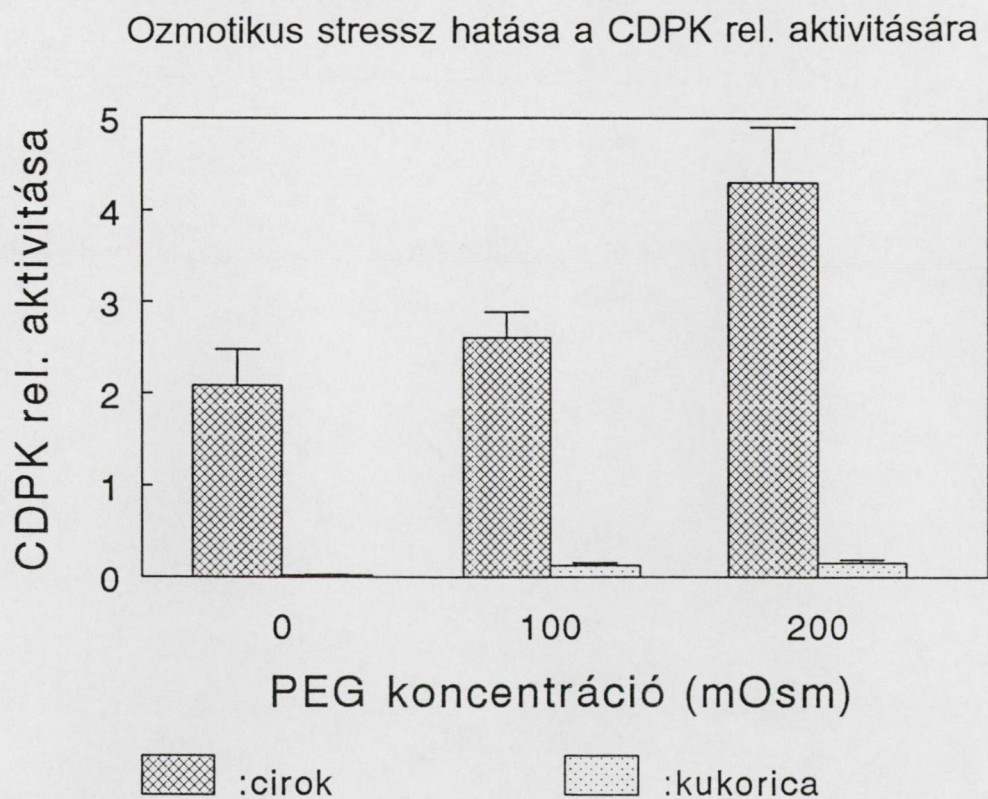
12. ábra: Különböző koncentrációjú tannin és ellagsav hatása citoszolikus kalcium-függő protein kináz (CDPK) foszforilációs aktivitás változására syntide-2 szubsztrát jelenlétében. Koncentrációk logaritmikus skála szerint.

Alacsony koncentrációban a tannin (0,1 és 1 μM) és az ellagsav (0,1, 1 és 10 μM) emelte az enzimaktivitást. Magasabb koncentrációknál (5-100 μM) csak a tanninsav esetében tapasztaltunk jelentős gátlást, az ellagsav a kezdeti aktivitás-növekedés után igen gyenge csökkenést, azaz gátló hatást mutatott. A kináz maximális aktivitásánál kapott tannin és ellagsav koncentráció értékek hasonlóak a H^+ -ATPáz gátlásához szükséges IC_{50} értékekhez (Erdei és mtsai, 1994).

5.2 A CDPK stresszindukciója

5.2.1 Ozmotikus indukció, koncentráció- és időfüggés

Korábbi mérések igazolták, hogy só és nem-ionos ozmotikus stressz (polietilén glikol) hatására a cirok és a kukorica eltérő fiziológiás válaszokat ad (Erdei és mtsai, 1995 és 1996). Három gabonanövényt, egy mérsékelten szárazságtűrő kukorica fajtát, egy jó szárazságtűrő cirok fajtát és egy nem szárazságtűrő búza fajtát (Kata) használtam a CDPK stressz-indukciójának és néhány jellemzőjének bemutatására. A kalcium-függő protein kináz PEG-indukálhatósága jelentős eltérést mutatott a cirok és a kukorica között 3 napos PEG kezelés után (13. ábra).

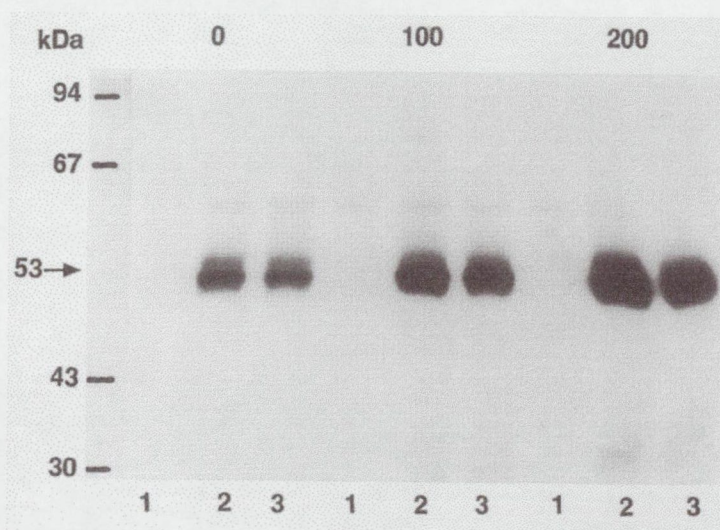


13. ábra: A CDPK autofoszforilációs aktivitás változása 100 μM CaCl_2 jelenlétében 3 napos 200 mOsm-os PEG kezelés hatására cirok és kukorica gyökérkivonatban.

A kukorica gyökérkivonatban alig mutatható ki a 3 napig tartó 200 mOsm-os ozmotikus kezelésre kalcium jelenlétében bekövetkező autofoszforiláció-változás, míg a cirokban jelentős autofoszforilációs aktivitás növekedés tapasztalható. A cirok és kukorica hajtásból nyert kivonat a legtöbb esetben alig mutatott aktivitás változást ozmotikus stresszre, ezért többnyire a gyökereket használtam a mérésekhez.

A 14. ábrán látható a cirok gyökér 2 órás 0, 100 és 200 mOsm koncentrációjú PEG kezelés hatásának autoradiogramja. A jelölődés az 53 kDa-os molekulásúly tartományában a legerősebb és a PEG koncentráció növekedésével arányosan növekedett.

A CDPK PEG-indukciója cirok gyökérben

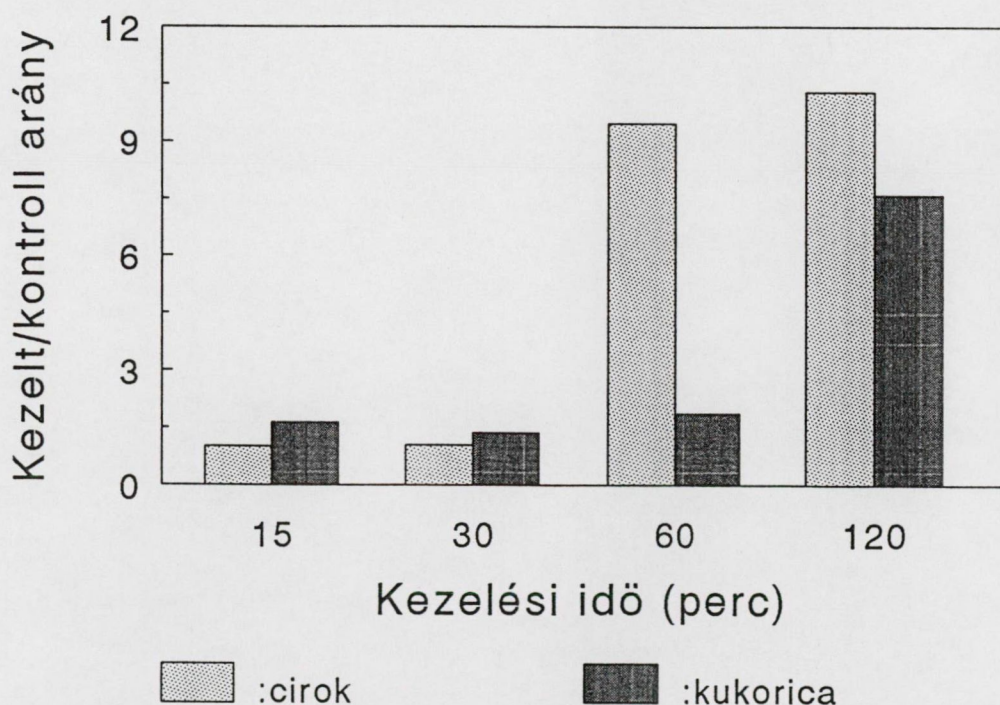


14. ábra: A CDPK autofoszforilációs aktivitása 2 órás 0, 100 és 200 mOsm PEG kezelés hatására cirok gyökérben. A jelölődés az 53 kDa-os molekulásúly tartományban látható az autoradiogramon.

1: - Ca^{2+} , 2: + Ca^{2+} , 3: + Ca^{2+} / kalmodulin.

Egyik célom az volt, hogy az ozmotikus-indukcióhoz szükséges legrövidebb kezelési időt megtaláljam. Ezért a kezelési időt cirok és kukorica gyökérkivonatát használva lecsökkentettem 15 percre. Ennél rövidebb idő technikai korlátok miatt nem volt lehetséges. 15, 30, 60 és 120 perc kezelési időket alkalmaztam (15. ábra). A kukorica gyökér kivonaton végzett mérések igen alacsony autofoszforilációs aktivitást mutattak, de az aktivitás-változások kezelt/kontroll arányát számolva hasonló PEG indukciót mértem mindkét faj esetében. Az első jelentős, közel 10-szeresére növekedett kezelt/kontroll arányt a 60 perces ozmotikus kezelés után figyelhetjük meg cirokban. Kukoricában 120 perc után kisebb, kb. 4-szeres aránynövekedést figyelhetünk meg. A cirok esetében a kezelés 2. órájában is változatlanul erős jelölődést tapasztalhatunk az 52-53 kDa-os tartományban.

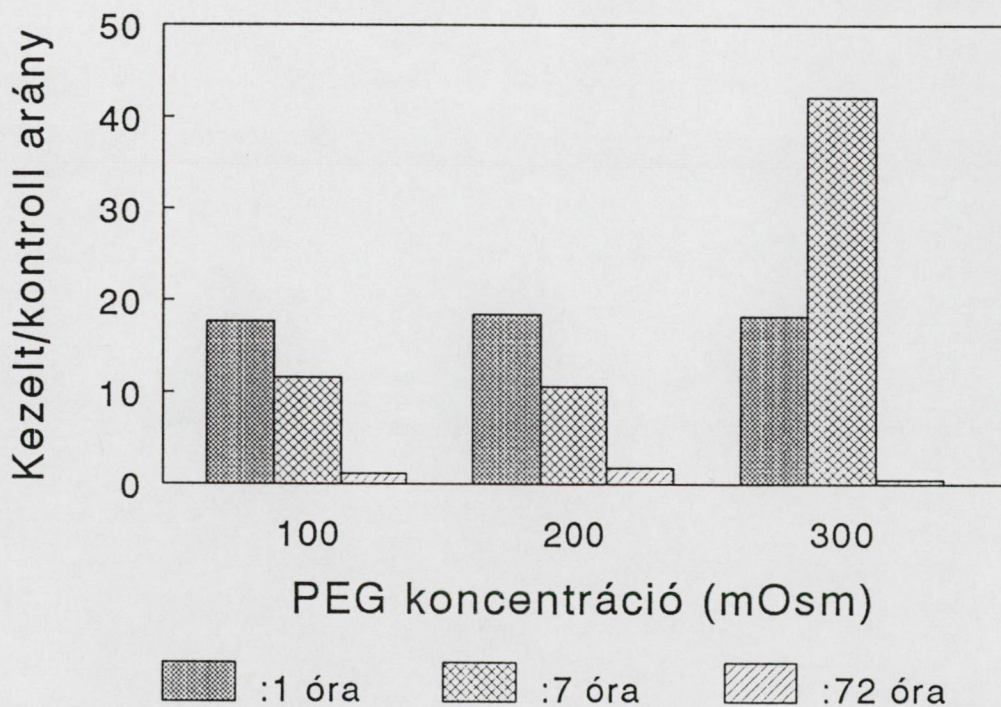
A CDPK PEG-indukciójának időfüggése cirokban és kukoricában



15. ábra: 15, 30, 60 és 120 perces 200 mOsm-os PEG kezelés hatására létrejött CDPK autofoszforilációs jelölődés cirok és kukorica gyökér esetében, 100 μ M CaCl_2 jelenlétében.

A nem szárazságtűrő búza "Kata" fajta esetében 100 μM CaCl_2 jelenlétében a hajtásban mutattunk ki jól mérhető CDPK aktivitást, a gyökér gyenge jelölődést adott. A különböző PEG koncentrációk (0, 100, 200 és 300 mOsm) és különböző kezelési idők (1, 7 és 72 óra) hatására létrejött autofoszforyláció jelölődésből számolt kezelt/kontroll arányt a 16. ábra mutatja. A stressz kezdeti időszakában (1 órás kezelésnél) erőteljes a CDPK indukciója, hiszen a kezelt növények aktivitása közel 20-szorosára emelkedett mindhárom alkalmazott ozmotikum-koncentrációnál. 7 óra után a kontrollhoz viszonyítva kisebb mértékű volt az aktivitás-növekedés 100 és 200 mOsm esetében, de a 300 mOsm kb. 40-szeres aktivitás-emelkedést idézett elő. Tartós, 72 órás PEG kezelés nem idézett elő számottevő változást az autofoszforylációs jel erősségében.

A CDPK PEG-indukciójának időfüggése búzában



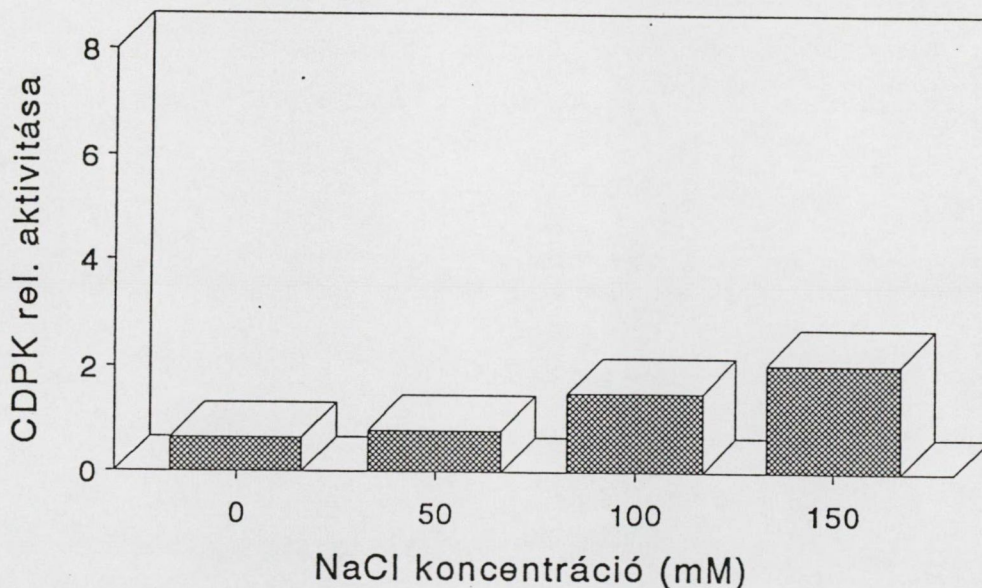
16. ábra: 1, 7 és 72 órás 100, 200 és 300 mOsm PEG kezelés hatására létrejött CDPK (49 kDa) aktivitás-változás kezelt/kontroll arányban kifejezve búza "Kata" hajtásban.

5.2.2. NaCl indukált változások a CDPK autofoszforilációs aktivitásában

5.2.2.1 A NaCl-os kezelés hatása a glükofita búzára ("Kata" és "Tiszatáj")

Egy nem szárazságtűrő búza fajtát (*Triticum aestivum* L. cv. GK-Kata), valamint egy szárazságtűrő fajtát (cv. GK-Tiszatáj) kezeltem 0, 50, 100 és 150 mM-os NaCl oldattal 1, 7 és 72 óráig (17/A - "Kata" és 17/B - "Tiszatáj" ábrák). Mindkét búza fajtánál a NaCl-indukált autofoszforilációs CDPK aktivitás emelkedés jól mérhetően a hajtásban jelentkezett 52-53 kDa molekulasúly tartományban, a gyökérben csak gyengén jelölődött.

A CDPK NaCl-indukciója búza "Kata" hajtásban



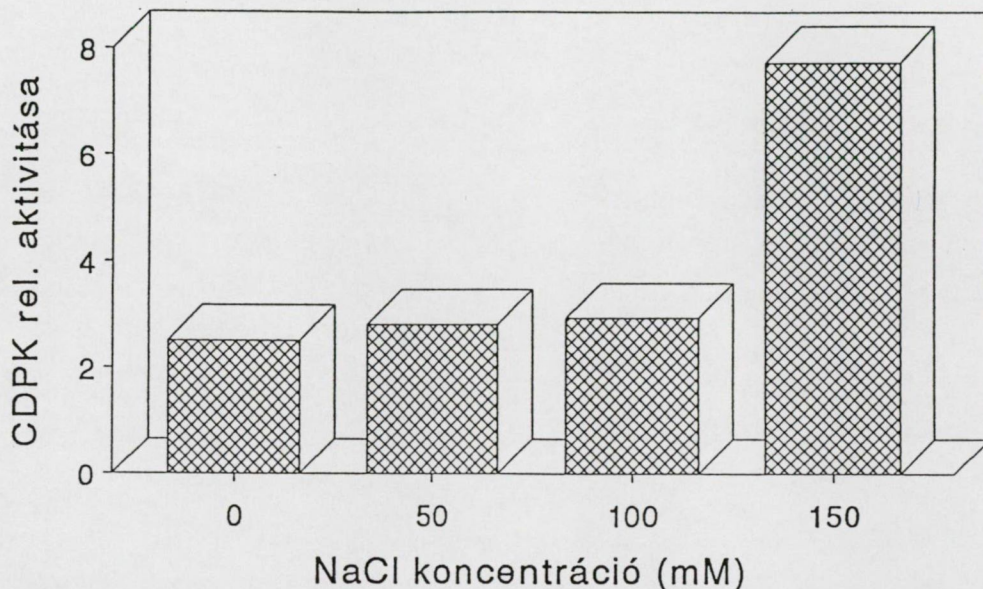
17/A ábra: 3 napos (72 órás) 0, 50, 100 és 150 mM NaCl kezelés hatása a CDPK (53 kDa) autofoszforilációs aktivitás-változására búza "Kata" hajtásban.

A nem szárazságtűrő "Kata" fajtánál az 50 mM NaCl kezelés hatására 100 μ M CaCl_2 jelenlétében nem történt szignifikáns autofoszforilációs aktivitás-változás. Ellenben, 100 mM NaCl esetében kb. kétszeres, ill. 150 mM NaCl-nál közel 3-szoros ez a növekedés, bár a CDPK relatív aktivitása igen alacsony volt

(17/A ábra).

A szárazságtűrő "Tisztáj" esetében mért NaCl-indukált aktivitás-változás mintázata és a jelölődés erőssége eltérést mutatott a "Kata"-hoz képest (17/B ábra).

A CDPK NaCl-indukciója búza "Tisztáj" hajtásban



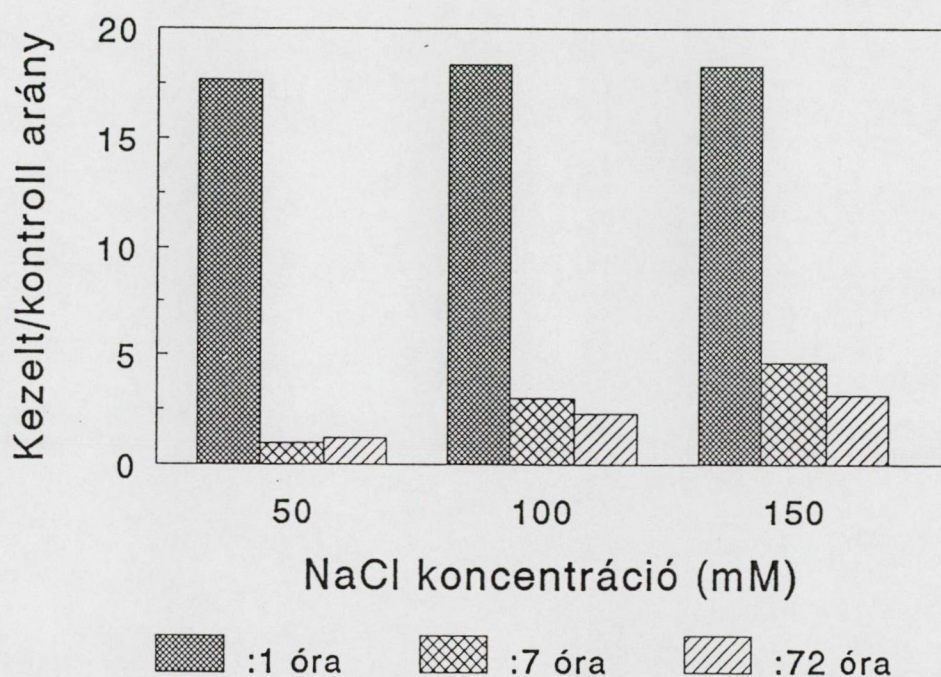
17/B ábra: 3 napos (72 órás) 0, 50, 100 és 150 mM NaCl kezelés hatása a CDPK (53 kDa) autofoszforilációs aktivitás-változására búza "Tisztáj" hajtásban.

A "Tisztáj" erősebb jelet adott, míg a "Kata" igen gyengét. Megfigyelhetjük, hogy az alacsonyabb NaCl koncentrációknál (50 és 100 mM) a kalcium jelenlétében mért autofoszforilációs aktivitás növekedés nem jelentős. A legmagasabb sókoncentrációnál, 150 mM NaCl-nál, mutattuk ki a legnagyobb aktivitás emelkedést a kontrollhoz képest.

A nem szárazságtűrő "Kata" fajtán megvizsgáltam a különböző kezelési idők (1, 7 és 72 óra) és különböző NaCl-koncentrációk (0, 50, 100 és 150 mM) CDPK-indukciójára tett hatását (18. ábra). A rövid idejű, 1 órás, NaCl kezelés hozta létre a legmagasabb CDPK aktivitási értékeket, közel 20-szorosára emelkedett a kezelt/kontroll arány. A 7 órás sókezelés jóval gyengébb kináz

aktivitás-emelkedést eredményezett. A 100 mM NaCl jelenlétében kb. 3-szorosára, míg 150 mM NaCl közel 4-szeresére nőtt az aktivitás a kontrollhoz képest. A hosszabb ideig tartó, 72 órás, sókezelések a 7 óráshoz hasonló mértékű, de még annál is alacsonyabb kezelt/kontroll arányokat hoztak létre. 100 mM NaCl esetében kb. kétszeres, míg 150 mM NaCl-nél kb. 3-szoros aktivitás-növekedést tapasztaltunk. A "Kata"-val végzett CDPK PEG-indukciójának időfüggése nagyon hasonló mintázatot vett fel.

A CDPK NaCl-indukciójának időfüggése búzában



18. ábra: 1, 7 és 72 órás 50, 100 és 150 mM NaCl kezelés hatására létrejött CDPK (49 kDa) aktivitás-változás kezelt/kontroll arányokban kifejezve búza "Kata" hajtásban.

5.2.2.2 A NaCl-os kezelés hatása a halofita *Aster tripolium*-ra

A tengerparti halofita növényt, az *Aster tripolium*-ot 1 hónapig különböző koncentrációjú, 0, 2, 10 és 300 mM NaCl oldatot tartalmazó tápoldatban neveltük (1. kép). Az utóbbi, 300 mM NaCl koncentráció, hozzávetőleg a fiziológiás körülményeknek felel meg. Sómentes, alacsony (2 mM) vagy magas (300 mM) sótartalmú tápoldat kedvezőtlenül hatott a növény növekedésére. A legerőteljesebb növekedést 10 mM NaCl koncentrációnál tapasztaltuk (1. kép).

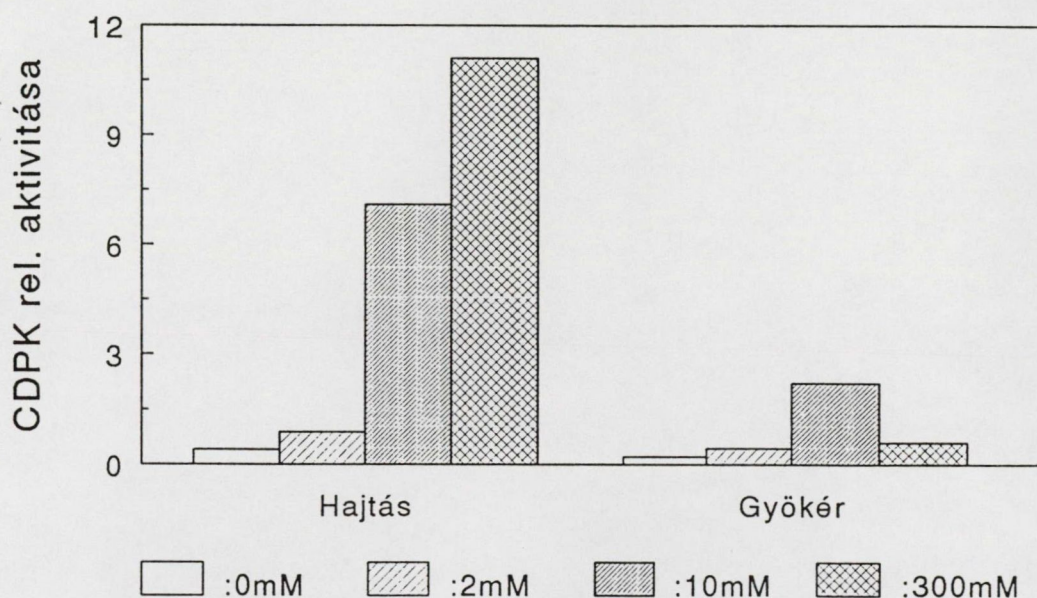
Aster tripolium ssp. *tripolium* fejlődése eltérő NaCl konc-jú tápoldatokban



1. kép: *Aster tripolium* ssp. *tripolium* nevelése vízkultúrában 0, 2, 10 és 300 mM NaCl koncentrációjú tápoldatban.

Mindkét növényi részben (hajtás és gyökér) kimutatható volt az autofoszforylációs aktivitás. A gyökerekből vett mintákban a kontrollhoz képest jelentős aktivitás-növekedés 10 mM NaCl kezelés hatására jött létre, a 300 mM NaCl-ban nevelve az aktivitás értéke megegyezett a kontrolléval (19. ábra). A hajtásban emelkedő autofoszforylációs aktivitás jött létre a növekvő sókoncentrációval. A 10 mM NaCl-os kezelésre a gyökérhez viszonyítva jóval nagyobb aktivitást mértem és ez tovább növekedett a 300 mM NaCl kezelés után.

A CDPK NaCl-indukciója *Aster tripolium*-ban

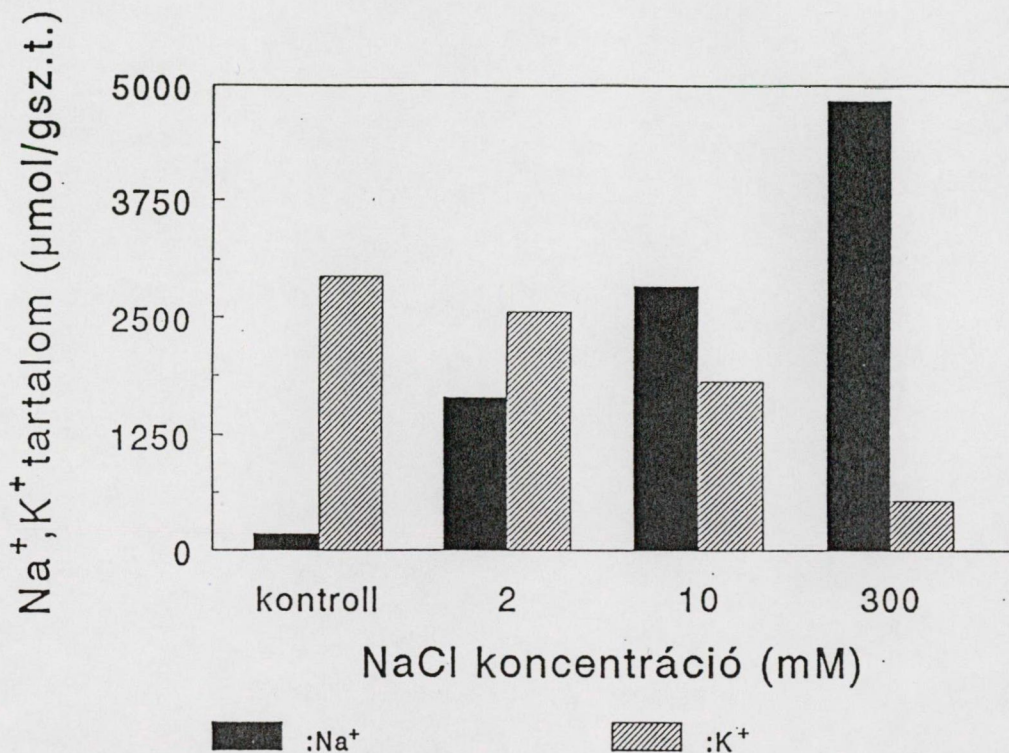


19. ábra: Sóstressz (0, 2, 10 és 300 mM NaCl-os oldat) indukált CDPK autofoszforylációs aktivitás változás a halofita *Aster tripolium* gyökérében és hajtásában 49,5 kDa-os jelölődés.

Az *Aster tripolium* gyökereinek gyenge reakciója az emelkedő NaCl koncentrációra valószínűleg annak köszönhető, hogy növény igyekszik a gyökérből a hajtásba pumpálni a Na^+ -t, így az adott sóra hígulást idéz elő és

kevésbé károsodik az ionháztartás megváltozása miatt. A csoport korábbi mérései igazolták a Na^+ transzlokációját a gyökérből a hajtásba (Erdei és Kuiper, 1979). Jelenlegi atomabszorpciós méréseink pedig az emelkedő NaCl-koncentrációval arányosan a levelekben növekvő Na^+ és csökkenő K^+ tartalmat mutatott (20. ábra).

NaCl kezelés hatása az *Aster tripolium* levél Na^+ és K^+ tartalmára

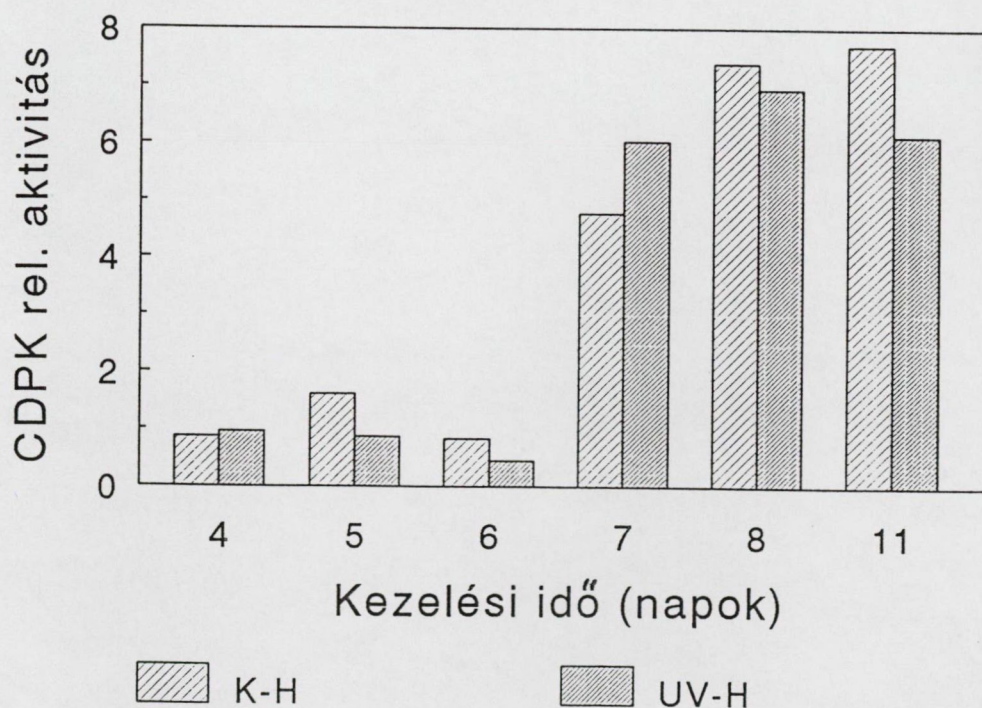


20. ábra: Az *Aster tripolium* levél Na^+ és K^+ tartalmának változása 0, 2, 10 és 300 mM NaCl kezelés hatására.

5.2.3 UV-B kezelés hatása a CDPK indukciójára búzában (Tiszatáj)

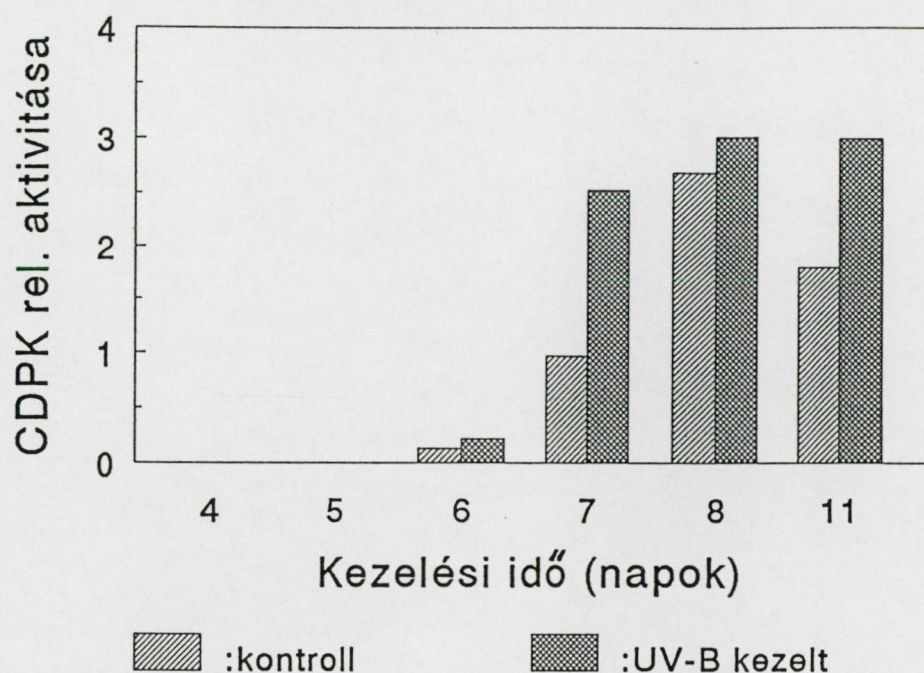
Az UV-B sugárzás vizsgálatakor használt búza "Tiszatáj" fajta szárazságtűrő. A kezelés a kiültetés napján kezdődött és 11 napig tartott. Mintákat a 4. naptól a 8. napig naponta, majd a 11. napon vettem. UV-B sugárzás hatására jól látható elváltozást, sötétlilás elszíneződést figyelhattunk meg már néhány nappal a kezelés megkezdése után a növények szárának alsó részén, az epidermális sejtekben (Barabás és mtsai, 1998). A flavonoid típusú pigmentek felhalmozódása védelmet jelent a fotoszintetikus funkciók károsodása ellen (Tevini és mtsai, 1991). A kezelés 7. napján ugrásszerű autofoszforilációs aktivitás-változást figyelhattunk meg 52 kDa-nál (21/A ábra) és 65 kDa-nál (21/B ábra), ellenben CDPK (52 kDa) esetében UV-B-indukciót nem tapasztaltunk.

A CDPK (52 kDa) UV-B-indukciója búza hajtásban



21/A ábra: UV-B kezelés hatása a CDPK (52 kDa) autofoszforilációs aktivitására búza "Tiszatáj" hajtásban.

A CDPK (65 kDa) UV-B-indukciója búza hajtásban



21/B. ábra: UV-B kezelés hatása a CDPK (65 kDa) autofoszforilációs aktivitására búza " Tiszatáj" hajtásban.

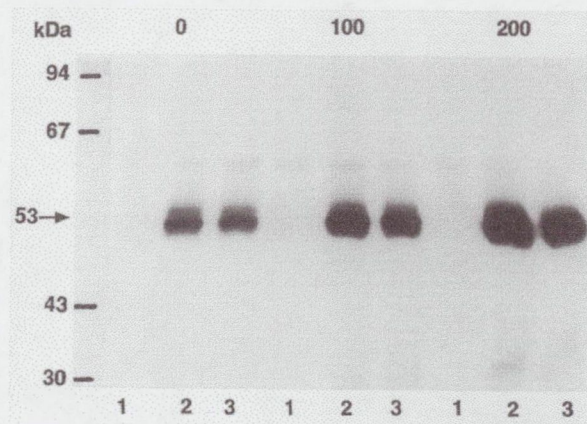
A CDPK (65 kDa) eredmények az UV-B kezelést követő 7. napra több, mint kétszeres aktivitás-növekedést mutatnak a kezeletlenhez képest. A következő napra (8. nap) a kezelt és a kezeletlen értékek nem mutatnak szignifikáns különbséget, majd a 11. napra újra az UV-B kezelt minták aktivitása lesz magasabb, közel 60 %-kal haladja meg a kontrollét.

5.2.4 Abszcizinsavas előkezelés hatása az ozmotikus indukcióra cirokban

Az abszcizinsavas előkezelés tanulmányozása során a magoncoknál a kiültetéstől számított 5. napon kezdtük el a 0,1 μM abszcizinsavas előkezelést, majd 3 nap után az ABS-kezelt növények egyik felénél 200 mOsm PEG 6000-rel létrehozott ozmotikus stresszszel egészítettük ki a kezelést. A kettős kezelést 3 napig folytattuk, ezután feldolgoztuk a mintákat.

Az 53 kDa-os CDPK aktivitás változását tudtuk kimutatni (22. ábra). A kontroll minták kalcium hiányában (2 mM EGTA) és kalcium jelenlétében (100 μM CaCl_2) is gyenge CDPK aktivitást mutattak. A kezeletlen mintához képest az abszcizinsavas kezelés kisebb, kb. 12 %-os autofoszforylációs-aktivitás növekedést eredményezett. A 3 napos 200 mOsm-os PEG kezelés hatására jelentős, több mint 6-szoros CDPK-aktivitás növekedés tapasztalható a kontrollhoz képest. A 3 napos ABS előkezelés lecsökkentette a PEG jelentős induktív hatását, így már csak 3-szoros aktivitás-növekedést tapasztaltunk.

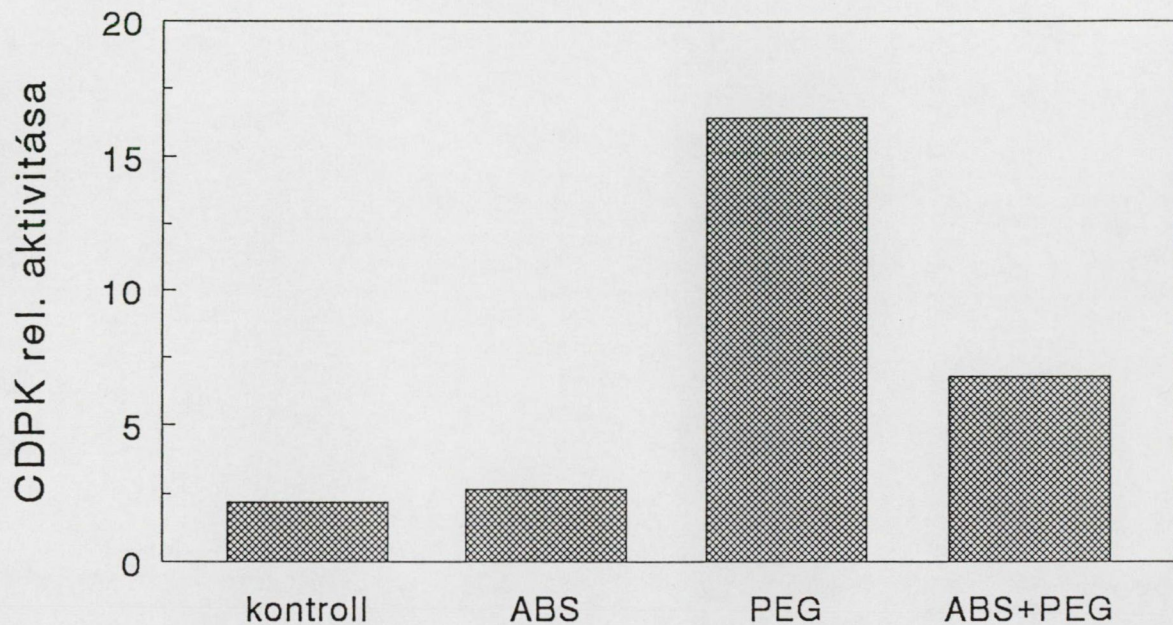
ABS előkezelés hatása a CDPK PEG-indukciójára cirokban



22. ábra: 3 napos 0,1 μM ABS előkezeléssel összekötött 3 napos 200 mOsm-os PEG kezelés hatása a CDPK autofoszforylációs aktivitására cirok gyökérben (53 kDa). E: 2 mM EGTA, Ca^{2+} : 100 μM CaCl_2

Az eredmények denzitometriás kiértékelését a 23. ábra mutatja. Az előkezelés hatására létrejövő alacsonyabb CDPK PEG-indukció valószínűleg a korábbi ABS kezelésre már aktivizálódó folyamatoknak köszönhető.

ABS előkezelés hatása a CDPK PEG-indukciójára cirokban



23. ábra: 3 napos 0,1 μM ABS előkezeléssel összekötött 3 napos 200 mOsm-os PEG kezelés hatása a CDPK autofoszforilációs aktivitására cirok gyökérben (53 kDa). E: 2 mM EGTA, Ca^{2+} : 100 μM CaCl_2

PEG: 200 mOsm PEG, ABS+PEG: 0,1 μM ABS + 200 mOsm PEG

6. Eredmények értékelése

Dolgozatomban néhány környezeti tényező, a szárazság-, só- és UV-B-stressz hatását vizsgáltuk a növényi jelátviteli rendszer egy elemére, a kalcium-függő kalmodulin-független protein kináz autofoszforylációs aktivitására. A stressz tényezők hasonló kaszkád mechanizmusokat hoznak létre mind a növényi, mind az állati rendszerekben. Stressz körülmények között leggyakrabban a fehérjék foszforylációs mintázatában és aktivitásában, a génindukcióban és az új stressz fehérjék szintézisében bekövetkező változásokat észlelhetjük. Az általunk is vizsgált CDPK szabályozó doménje 40 %-os szekvencia azonosságot mutat az emlős agyból izolált kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II (CaMKII) kalmodulin-kötő doménjével (Harper és mtsai, 1991). A CaMKII-nak igen jelentős szerepet tulajdonítanak a különböző fehérjék foszforylációs aktiválásán keresztül az agy jelátviteli folyamatainak szabályozásában. Feltételezték, hogy a növényi jelátviteli folyamatoknál a kalcium-függő vagy kalmodulin-szerű domént tartalmazó protein kinázoknak (CDPK) szintén kulcsfontosságú szerepük van.

Méréseink során olyan stressz-indukált autofoszforylációs jelölődést azonosítottunk, amely néhány biokémiai tulajdonsága alapján a már ismert kalmodulin-szerű domént tartalmazó protein kinázokkal (CDPK) mutatott rokonságot, amelyet Hanks és Hunter (1995) az eukarióta protein kinázokat felosztó rendszerében a 'CaMK' csoport tagjaként tart számon (3. ábra). A stressz-indukált jelölődés többnyire 52-53 kDa-nál, búzánál és a halofitánál 49 kDa és 65 kDa-nál látható, kalcium-függő, de kalmodulin-független autofoszforyláció jellemző rá. A specifikus kalmodulin antagonistá trifluoperazin koncentráció-függően gátolja az autofoszforylációt. A CDPK-specifikus syntide-2 exogén szubsztátot foszforylálja, enzim aktivitását másodlagos metabolitok pl. tanninsav magasabb koncentrációban gátolja. Az általam mért jellemzők megegyeznek Sopory és Munshi (1998) protein kinázokról és foszfatázokról írt összefoglaló cikkében a CDPK-kat jellemző biokémiai sajátosságokkal.

A CDPK-k jellemzéséről igen nagyszámú irodalom jelent meg és szinte napról-napra újabbak látnak napvilágot, de környezeti stresszre történő indukciójukról viszonylag kevés cikket találunk. Kísérleteinkben a stressz-

indukciót különböző abiotikus stressz típusokkal váltottuk ki, a szárazság stresszt nem-ionos ozmotikus (PEG) kezeléssel, a sóstresszt NaCl kezeléssel és az UV-B stresszt UV-B-t is sugárzó lámpákkal. A vizsgált növények különböző stressz érzékenyséű gabonafajok és -fajták, a szárazságtűrő indiai kenyércirok és a "Tiszatáj" búza fajta, a kevésbé szárazság- és sótűrő kukorica és a "Kata" búza fajta, a tengerparton élő halofita, az *Aster tripolium ssp. tripolium*. A növények eltérő autofoszforilációs jelölődést hoztak létre a különböző stressz típusok hatására. Eredményeink igazolják a stressz-indukció létét és néhány tulajdonsága jól összeegyeztethető az irodalmi adatokkal.

A CDPK PEG-indukcióját cirok, kukorica és a "Kata" búza fajtán vizsgáltuk. A cirok és kukorica autofoszforilációs jelölődésének összehasonlításakor kitűnt, hogy a gyökérben, különösen a ciroknál, magas, koncentrációtól- és kezelési időtől-függő aktivitásokat figyelhetünk meg, míg ugyanez hajtásban nem mérhető. A CDPK aktivitásának ilyen jellegű változása összhangban lehet a citoplazmatikus kalcium-szint emelkedés diurnális, ill. szerv- és szövetspecifikus voltával. Feltételezzük, hogy az effektív kalcium-jel csak abban a sejt típusban fordul elő, amelyik a válaszban is részt vesz, pl. szárazság esetén csak a gyökérben figyelhető meg a kalcium-jel, míg hideg stressznél az egész növényben (Knight és Knight, 2000). A kukorica gyökérben igen alacsony, koncentrációtól alig, de kezelési időtől függő értékeket kaptunk. A kezelési időknél kezelt/kontroll arányt számoltunk és az erősödő jelölődés ciroknál már 1 órás, kukoricánál 2 órás 200 mOsm PEG kezelés után a CDPK indukcióját jelezte. A búza "Kata" hajtás PEG-indukciójára és annak idő-függésre jellemző, hogy az aktivitás viszonylag alacsony, koncentrációtól nagyrészt független, időfüggése hasonló a ciroknál és kukoricánál megfigyeltékhez. A kezdeti, 1 órás kezelés, erőteljes CDPK-indukciót mutat, majd 7 órás kezelés után az aktivitás-emelkedés már csak a 300 mOsm PEG esetében számottevő. A 72 órás, azaz 3 napos, ozmotikus stressz után szintén igen alacsony a kezelt/kontroll arány, nem jelentős a PEG-indukció. A búza "Kata" hajtásban mért PEG-indukció koncentráció- és időfüggése hasonló mintázatot mutat a sóstressz által kiváltott indukcióhoz. Megfigyelhetjük, hogy a stressz-érzékeny fajoknál, mint a kukorica és a búza "Kata" fajta, gyökérnél és hajtásnál egyaránt igen csekély CDPK-

indukció mutatható ki.

A CDPK NaCl-indukciójának vizsgálatához két glükofita, a szárazságtűrő "Tiszatáj" és a kevésbé szárazságtűrő "Kata" búza fajtákat, valamint a halofita *Aster tripolium*-ot használtuk. Sókezelés hatására az általam vizsgált búza fajtákban és a halofitában is különbséget találtam a gyökér és hajtás kivonatokban mért CDPK autofoszforilációs aktivitások között. A gyökérben sokkal gyengébb, gyakran a kimutatási érték alatti aktivitás értékeket kaptam, míg hajtásban jól mérhető a jelölődés. A glükofita búzában a gyökér alacsony aktivitási értékei a kezelés korai szakaszában, 1-2 óra után, összefüggésben lehetnek a NaCl-indukció idő-függésével. Az *A. thaliana*-ból izolált *Esi47* homológok esetében a hajtásban jóval hamarabb, már 2 órás NaCl-kezelésre megjelenik és 24 óra múlva maximális az mRNS felhalmozódás, míg gyökérben később, 6 óra után a legerősebb a génkifejeződés és 24 óra után eltűnik (Shen és mtsai, 2001). Más sóérzékeny búza fajtánál (Chinese Spring) is kimutatták, hogy a stressz korai szakaszában a gyökér gyenge, idővel lassan emelkedő aktivitást ad az ESI mRNS felhalmozódásában (Galvez és mtsai, 1993).

Az általam is vizsgált két eltérő szárazságtűrésű búzafajta kontroll körülmények között is eltérést mutatott bizonyos ozmotikumok koncentrációjában. Szegletes és munkatársai (2000) kimutatták, hogy a "Tiszatáj" jóval magasabb prolin és putreszcin tartalommal rendelkezik, mint a "Kata". Sótoleráns fajták esetében gyakori a prolin felhalmozás, ezért feltételezzük, hogy a "Tiszatáj" nemcsak jobb szárazság-, de jobb sótoleranciával is rendelkezik. Stressz körülmények között a glicin-betain szint növekedése figyelhető meg a kontrollhoz képest mindkét fajtánál. A "Kata"-nál nagyobb mértékű a felhalmozás, de ez mégsem jelent nagyobb stressz-toleranciát.

A CDPK NaCl-indukciójának mintázata, azaz koncentráció- és időfüggése, is különbözik a két búza fajtánál. Az indukció koncentráció-függésre jellemző, hogy a "Kata" hajtás gyenge, de sókoncentrációval emelkedő aktivitást mutat, míg a "Tiszatáj" erősebb jelölődést ad, viszont a jel az alacsonyabb koncentrációknál (50 és 100 mM) nem emelkedik a kontroll szintje fölé, míg 150 mM esetében több mint kétszeresére növekszik. A NaCl-kezelés koncentrációjától függő ESI mRNS felhalmozódást más szerzők is kimutattak

sótűrő és sóérzékeny fajokban is (Galvez és mtsai, 1993). A NaCl-indukciójának időfüggését a "Kata" hajtásain 0, 50, 100 és 150 mM NaCl koncentrációjú tápoldattal 1, 7 és 72 órás kezelésekkkel, a PEG-indukcióval egyező körülmények között végeztük. Az NaCl-indukció időfüggése megegyezik a PEG-indukció időfüggésével.

A halofitáknál, pl. a sótűrő *Lophopyrum elongatum* gyökerénél kimutatták, hogy NaCl-kezelésre egy két fázisos ESI (early salt stress induced) mRNS felhalmozódás indul meg. Az első szakaszra egy gyors nagy mértékű felhalmozódás jellemző, kb. 6 óra után éri el a maximális értéket. Ezután egy ugyanolyan gyors csökkenést tapasztalunk, ami hosszabb, 72 órás kezelés után is csak alacsony értékeket vesz fel (Galvez és mtsai, 1993). Az ESI47 génterméke egy olyan szerin/treonin protein kináz, amely stressz-indukált, molekulásúlya (49,38 kDa) hasonló a halofita *Aster tripolium*-ból általunk izolált CDPK-hoz és feltételezik, hogy szerepe van a növényi jelátvitelben, de nem CDPK homológ. Az *Aster tripolium*-ból származó eredményeim nem szolgáltatnak információt a NaCl-indukció kezdeti idő-függésére, mert a kezelési idő hosszú, 1 hónapos volt, ami már kívül esik az alarm fázison. A halofitánál a gyenge gyökér jelölődés oka az lehet egyrészt, hogy az 1 hónapos kezelés az említett elhúzódó alacsony aktivitású szakaszba tartozik. Másrészt, hogy a Na⁺ azonnal transzlokálódik a gyökérből a hajtásba, így a stressz hatás inkább a hajtásban jelentkezik és nem a gyökérben. Ez a mechanizmus bizonyítást nyert más halofitáknál is, pl. a *Plantago maritima*-nál, amely a szikesek sótűrő útifű-féléje (Erdei és Kuiper, 1979).

Az autoradiográfias jel nagyságát tekintve mind a kukorica, mind a "Kata" igen gyenge jelölődést adott, ellenben a "Tiszatáj", a cirok és az *Aster tripolium* erős jeleket (10. ábra, 17. ábra). Szárazságtűrés szempontjából a "Kata" és a kukorica is érzékenynek tekinthető, tehát nem toleráns a stresszre. Kezelt/kontroll arányt tekintve a stressz érzékeny kukorica és a búza "Kata" fajta is mutat CDPK-indukciót, de ez inkább csak a stressz korai szakaszára, 1-2 óra után, az alarm fázisra jellemző. Az ozmotikus- és sóstressz toleráns fajok, a cirok és az *Aster tripolium*, valamint a búza "Tiszatáj" fajta 3 napos PEG ill. NaCl kezelések után is jelentős CDPK-indukciót kapunk (10. ábra, 17. ábra, 19. ábra). Kísérleti

eredményeimből azt a következtetést vontuk le, hogy a stressz toleránsabb faj, fajta erőteljesebb CDPK-indukciót mutat. A kalcium-függő protein kinázok jelenléte, aktivitásának fokozódása stressz körülmények között nélkülözhetetlen a jelátviteli folyamatok zavartalan működéséhez. A megfelelő stressz fehérjék expressziójának elősegítésével a növények számára védelmet jelent a stressz károsító hatásaival szemben.

Az UV-B kezelés hatására megjelenő anthocián felhalmozódás a stressz meglétét igazolja, bár a stressz-indukált CDPK (52 kDa) UV-B-indukciót nem mutatott. A CDPK (65 kDa) jelölődése jóval kisebb erősségű volt, de a 7 napnál több mint kétszeres az UV-B kezelt minta autofoszforilációs aktivitása a kezeletlenhez viszonyítva. A 8. napnál eltűnik, majd a 11. napon újra megjelenik az UV-B-indukció. Az UV-B kezelés 6. napjától tapasztalható ugrásszerű aktivitás-emelkedés összhangban vannak az antioxidáns védekezőrendszer enzimatis tagjaiban (guajakol peroxidáz, glutation peroxidáz) tapasztalható aktivitás-változásokkal (Barabás és mtsai, 1998). A CDPK gyenge UV-B-indukciójának egyik oka lehet, hogy a búza "Tiszatáj" kevésbé toleráns az emelkedett UV-B sugárzásra. A másik oka lehet, hogy oxidatív stressz esetén figyelembe kell vennünk a kalciumon kívül szerepet játszó más jelhordozó molekulákat, mint pl. a NO^\cdot , a H_2O_2 és a O_2^\cdot . Ezek a peroxiszmákban képződnek és a citoplazmába kijutva fontos jelátvivőkké válnak a többi sejtszervecskével való kapcsolattartásban, de pontos jelátviteli mechanizmusukat még nem ismerik (Corpas és mtsai, 2001). Valószínűleg a jelátvitelben a CDPK mellett más enzimek is nagy jelentőséggel bírnak.

Láthattuk, hogy a vizsgált kináz (52-53 kDa) autofoszforilációs aktivitását többféle stressz hatás is befolyásolja, koncentráció és kezelési időtől függően. Sőt, a növény fajok, fajták között a stressz-érzékenységbeli különbséget is tükrözi a CDPK indukciós mintázata. A stressz-indukált és a jelátvitelben fontos protein kináz mellett azonban a stressz korai érzékelésében és az adaptációt elősegítő fehérjék indukálásában az abszcizinsav kulcsfontosságú szerepét sem felejtethjük el. A kezdődő vízhiányra és sóstresszre igen rövid idő alatt felhalmozódó abszcizinsav olyan transzkripció faktorok (MYC/MYB, bZIP) szintézisét aktiválja, amelyek ABRE szabályozó elemmel rendelkező gének expresszióját fokozzák.

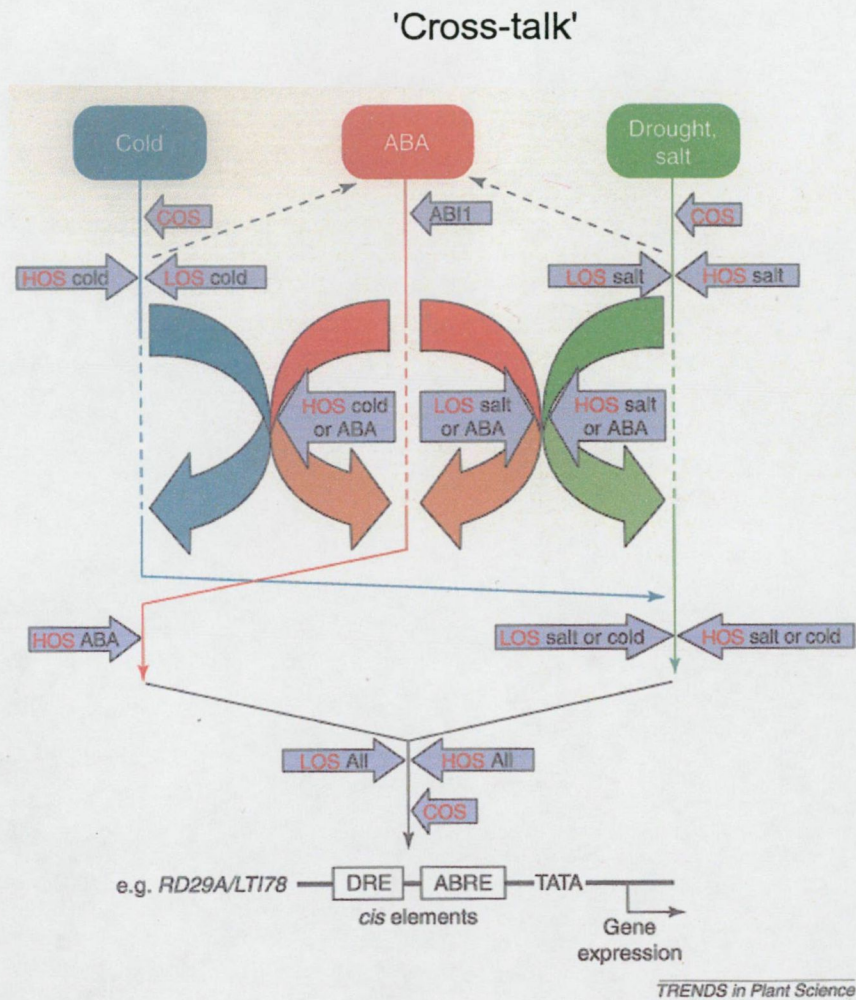
Valószínűleg, az ABS szintéziséért felelős gének is így aktiválódnak. Az emelkedett ABS koncentráció az adaptációt segíti elő és további ABS-igényes gének indukciójára ad lehetőséget.

A cirok gyökér abszcizinsavas előkezelésénél kapott eredményeink alapján feltételeztük, hogy exogén hormon hatására kalcium-függő protein kinázok aktiválódnak és néhány stresszfehérje, ozmoprotektív anyag termelődése is beindul. Ezt igazolja a 3 napos ABS kezelésnél megfigyelt magasabb CDPK aktivitás. Az ozmotikus stresszre megjelenő jelentős autofoszforylációs aktivitás-növekedés azt bizonyítja, hogy a cirok képes CDPK-indukcióra. A kettős kezelés, 3 nap ABS előkezelés, majd 3 nap PEG és ABS együtt, már nem jelentett olyan erős stresszt. Feltételezhető, hogy a növény a már meglévő enzimeket használta, így nem volt szüksége olyan erőteljes CDPK-indukcióra, mintha csak PEG kezelést kapott volna.

A növényeket leggyakrabban azonban nem egy, hanem egyszerre több káros környezeti hatás is éri. Ezeket jónéhány stressz típusba sorolhatjuk, de ennél lényegesen kevesebb az igénybe vett jelátviteli folyamatoknak a száma. A stressz-indukált CDPK esetében is tapasztaltuk, hogy a stressz típusa lehet más és más, de a kináz indukciója mindegyiknél megtalálható. Ez feltételezi, hogy a jelátviteli útvonalak legalább egy része közös legyen, közös elemekkel. A különböző abiotikus stressz hatásokra aktiválódó molekulák, enzimek számos kapcsolódási ponttal, ún. 'nodes'-zal rendelkeznek. Ilyen pl. a kalcium, a kalcium-szabályzott fehérjék, a MAPK kaskád és a transzkripciós faktorok (Knight és Knight, 2001). Szárazság- és sóstressz esetében pl. ugyanaz a transzkripciós faktor, a DREB2, aktiválódik és kapcsolódik az indukált gén promóter szakaszának DRE *cis* eleméhez. Hideg stressznél viszont egy másik típusú transzkripciós faktor, a DREB1 aktiválódik, de ugyanahhoz a DRE *cis* elemhez kötődik. Egyes stressz-indukált gének két féle, DRE és ABRE szabályozó elemmel is rendelkeznek. Mások két ABRE elemet tartalmaznak, mivel ez az elem önmagában nem funkcióképes. Az ABRE promóter szakasz abszcizinsav hatására indukálódik, de kifejeződéséhez a DRE elemre van szüksége. Bizonyos stressz-indukált gének aktiválása ABS-től függetlenül, MAP, CDPK és SNF1 kinázok közvetítésével zajlik. Valószínűleg ebben rejlik az ABS-függő és -

független génindukció magyarázata.

A különböző stressz típusok jelátvitelének kapcsolódásait és egymásra hatását 'cross-talk'-nak nevezzük. A 24. ábrán a szárazság-, só- és hidegstressz, valamint az abszcizinsav jelátvitelének kapcsolódásai és egymásra hatásai láthatók.



24. ábra: Hideg-, szárazság- és sóstressz, valamint az abszcizinsav jelátviteli mechanizmusának bemutatása *Arabidopsis* (*los*, *cos* és *hos*) mutánsokkal.

A mechanizmus modellezéséhez *Arabidopsis* mutánsokat (*los*, *cos* és *hos*) használtak. A génexpresszió szabályozását az *RD29A* hideg- és szárazság-indukált gének egyikén vizsgálták (Knight és Knight, 2001). Az *RD* klónok közé azt a 9 független cDNS-t soroljuk, amelyek szárazságra indukálódtak (*responsive to dehydration*) és közülük 6 ABS-függő, míg a többi ABS-független (Yamaguchi-Shinozaki és mtsai, 1992). A szerzők szerint az abszcizinsavval együtt jelentkező hideg- és sóstressz erősíti a génkifejeződést, ellenben az abszcizinsav nélküli kevert stressz, pl. hideg és sókezelés együtt, csökkenti az *RD29A* gén expresszióját. Az ozmotikus- és sóstressz esetén létrejövő ABS-függő és -független jelátviteli útvonalak kapcsolódásai meglepetéseket tartogathatnak még. Mindenesetre a génkifejeződés szabályozásának kiterjesztésével, az összetett környezeti hatásokra adott válaszreakciók így sokkal pontosabbakká, adekvátabbá válnak.

7. Összefoglalás

A dolgozat témája egy növényi kalcium-függő, de kalmodulin független protein kináz ozmotikus indukciójának vizsgálata különböző gabonanövényeken.

Különböző környezeti hatások, szárazság- és sóstressz, hormonok és mechanikai ingerek szinte ugyanazokat a biokémiai változásokat, kalcium- és abszcizinsav-szint emelkedést hoznak létre a citoplazmában. Az ugrásszerű kalcium-szint és a hozzá kapcsolódó enzimatisz folyamatok képezik a jelátvitel alapját. Ebben lényeges szerepet játszanak a foszforilációért felelős protein kinázok és foszfatázok, amelyek működésükkel más enzimek aktivitását megváltoztatják, és így segítik a jel sejtmagba jutását, a stresszválaszhoz szükséges gének transzkripció aktiválását. A protein kinázok sajátos növényi formái a kalcium-függő protein kinázok (CDPK), amelyek egyedi fehérjeszerkezettel szabályozzák foszforilációs aktivitásukat. A stresszválaszban szintén fontos szerepet játszó abszcizinsavval együtt a jelátviteli folyamatok irányításában vesznek részt.

Dolgozatomban három gabonanövényt, egy mérsékelten szárazságtűrő kukorica fajtát, egy jó szárazságtűrő cirok fajtát és két különböző szárazságtűrő búza fajtát, valamint egy sőtűrő tengerparton élő növényt, az *Aster tripolium ssp. tripolium*-ot használtam a kalcium-függő protein kináz jellemzésére és stressz-indukciójának bemutatására. Korábbi kísérletek igazolták, hogy só és ozmotikus stresszre, a kukorica és a cirok eltérő fiziológiás válaszokat ad, így jó alapaúl szolgálhat a stressztolerancia és a CDPK-indukálhatóságának vizsgálatára. Különböző stresszhatásokra (szárazság-, só- és UV-B-stressz) létrejövő CDPK-indukcióját és annak néhány jellemzőjét vizsgáltam. Kontroll körülmények között a CDPK néhány jellemzőjét, kalcium-, kalmodulin-függőségét és azok gátlását, exogén szubsztát foszforilálását írtam le. Szárazság- és sóstressz esetén a CDPK-indukcióját (52-53 kDa) figyeltem meg, az UV-B kezelésnek gyenge induktív hatása volt a megadott molekulásúly tartományban. A CDPK-indukció függött a stresszor koncentrációjától és a kezelési idő hosszától. Eltérést tapasztaltam a különböző stressz-toleranciájú fajok- és fajták között. Ciroknál az abszcizinsavas előkezelés stresszválaszt csökkentő szerepét is vizsgáltam.

A kísérletek során a magoncok vízkultúrában nőttek, a szárazság stresszt polietilén glikollal (PEG 6000) kiegészített tápoldattal váltottuk ki 0, 100 ill. 200 mOsm koncentrációban. A stressz hatások 0, 15, 30, 60, 120 percig és 3 napig tartottak. Célom volt az ozmotikus stresszválasz kiváltásához szükséges legrövidebb idő megtalálása. A sóstressz kivitelezése 0, 50, 100 és 150 mM NaCl-dal, 1, 7 és 72 óráig történt. Az UV-B kezelést a megfelelő tartományban is sugárzó lámpákkal végeztük. Az enzim működését radioaktívan jelzett [γ - 32 P] ATP, SDS-PAGE és autoradiográfia segítségével követtem nyomon. Az így kapott jelölődés többnyire az 53 kDa-os molekulasúly tartományba esett, míg UV-B besugárzott búza csíranövények esetében ez kiegészült egy 65 kDa-os gyengébben foszforilált, de a kezelésre erőteljesebb indukciót mutató jellel. A halofita *Aster tripolium* esetében az autofoszforilációs méréseket a levél Na^+ , K^+ tartalmának vizsgálatával egészítettem ki.

A protein kinázt egyértelműen kalcium-függőnek találtam, a kalcium kelátor EGTA hozzáadásakor nem vagy csak igen gyenge jeleket lehetett kimutatni. A protein kináz kalmodulin-független, ami a növényi CDPK-k sajátja, bár a kalmodulin antagonista trifluoperazin (TFP) gátolta a foszforilációs aktivitást.

A CDPK aktivitás mérésekor exogén szubsztrátot (syntide-2) foszforilálva két másodlagos metabolit, a tanninsav és az ellagsav enzim-aktivitást gátló hatását is vizsgáltuk. Eredményeink szerint, nagyobb koncentrációban (5-10 μM) a tanninsav gátlószerként működött, míg az ellagsav nagyobb koncentrációban sem gátolt. A gátlás valószínűleg nem specifikus, de néhány protein kinázra jellemző.

A CDPK stressz-indukciójának időfüggését vizsgálva cirokban már 1 órás ozmotikus (PEG) kezelés is elegendőnek bizonyult az autofoszforiláció megjelenéséhez. A CDPK-indukció jelentős eltérést mutatott az eltérő szárazságtűrésű növények, a cirok és a kukorica között. A kukorica gyökérből vett mintákon a CDPK relatív aktivitása igen alacsony értéknek bizonyult, de 2 órás PEG kezelés enzim-indukciót hozott létre. Hasonló volt a CDPK PEG és NaCl kezelésre bekövetkező indukciójának koncentráció- és időfüggése búzában. Az eltérő stressz-toleranciával rendelkező búza fajták szintén különböző foszforilációs mintázatot mutattak. A sóstressznél egy sókedvelő növény

bevonásával is vizsgáltuk a CDPK-indukciót, és a sókárosodás elleni mechanizmus igazolását atomabszorpciós Na^+ és K^+ tartalom mérésekkel is megerősítettük.

Az oxidatív stresszt képviselő UV-B kezelésre az autofoszforilációban bekövetkező változások jó egyezést mutattak a védelemben szintén szerepet játszó antioxidáns enzimek aktivitás-változásaival. A legtöbb esetben, így a CDPK (52 és 65 kDa) esetében is a kezelést követő 7. naptól tapasztalható jelentős aktivitás-növekedés, de UV-B-indukció csak a 65 kDa-os jelölt fehérjénél. Főbb eredményeim a következők:

- 1., Néhány tulajdonsága alapján feltételezzük, hogy az általunk kapott 52-53 kDa-os autofoszforilációs jelölődés egy kalcium-függő, kalmodulin-független protein kinázt (CDPK) takar.
- 2., Szárazság- és sóstressz hatására a CDPK stressz-indukciója, autofoszforilációs aktivitásának emelkedése következik be.
- 3., A stressz-indukció tulajdonságait vizsgálva megállapítottuk, hogy a CDPK indukció a stressz erősségével arányosan növekszik, és függ a kezelési idő hosszától.
- 4., Különbséget tapasztaltunk az eltérő stressztoleranciájú fajok, fajták CDPK indukciója között. Általában, a stressztoleránsabb fajra, fajtára erősebb CDPK-indukció jellemző.
- 5., Kimutattuk az abszcizinsavas előkezelés stresszválasz csökkentő hatását a CDPK autofoszforilációs jelölődésén.
- 6., A vizsgált CDPK a jel és a génexpresszió közötti jelátviteli útvonalban fontos közvetítő szerepet tölt be. A 'cross-talk' mechanizmus kapcsolódási pontjainak egyike.

A CDPK része az abszcizinsav jelátviteli folyamatainak is, ezért tulajdonságainak és stressz-indukciójának részletesebb vizsgálata lényeges lépést jelentene a növények stresszválaszainak jobb megértésében és a stressztolerancia esetleges javításában.

8. Irodalomjegyzék

- ALLEN**, G.J., **MUIR**, S., and **SANDERS**, D. 1995. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP-3 and cyclic ADP-ribose. - *Science* 268, 735-737.
- AMZALLAG**, G.N., **LERNER**, H.R. and **POLJAKOFF-MAYBER**, A. 1990. Exogenous ABA as a modulator of the response of sorghum to high salinity. - *J. Exp. Bot.* 233, 1520-1534.
- ANDERBERG**, R.J. and **WALKER-SIMMONS**, M.K. 1992. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10183-10187.
- BARABÁS**, K.N., **SZEGLETES**, ZS., **PESTENÁCZ**, A., **FÜLÖP**, K. and **ERDEI**, L. 1998. Effects of excess UV-B radiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. - *J. Plant Physiol.* 153, 146-153.
- BARTELS**, D., **SCHNEIDER**, K., **TERSTAPPEN**, G., **PIATOWSKI**, D. and **SALAMINI**, F. 1990. Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. - *Planta* 181, 27-34.
- BATTEY**, N.H. and **VENIS**, M.A. 1988. Calcium-dependent protein kinase from apple fruit membranes is calmodulin-independent but has calmodulin-like properties. - *Planta* 176, 91-97.
- BLATT**, M.R. and **THIEL**, G. 1993. Hormonal control of ion channel gating. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 543-567.
- BÖGRE**, L., **OLÁH**, Z. and **DUDITS**, D. 1988. Ca^{2+} -dependent protein kinase from alfalfa (*Medicago varia*): Partial purification and autophosphorylation. - *Plant Sci.* 58, 135-144.
- BRAY**, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. - *Plant Physiol.* 103, 1035-1040.
- VAN CAMP**, W., **VAN MONTAGU**, M. and **INZÉ**, D. 1998. H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance. - *Trends Plant Sci.* 3, 330-334.
- CORPAS**, F.J., **BARROSO**, J.B. and **del RÍO**, L.A. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells.

- Trends in Plant Sci. 6/4, 145-150.

DAVIES, W.J. and **YHANG**, J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. - Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol. 42, 55-76.

ERDEI, L. and **KUIPER**, P.J.C. 1979. The effect of salinity on growth, cation content, Na^+ - uptake and translocation in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. - Physiol. Plantarum 47, 95-99.

ERDEI, L., **OLÁH**, Z. and **BÉRCZI**, A. 1984. Phases in potassium transport and their regulation under near-equilibrium conditions in wheat seedlings. - Physiol. Plantarum 60, 81-85.

ERDEI, L. and **TRIVEDI**, S. 1989. Responses to salinity of wheat varieties differing in drought tolerance. In: Tazawa, M., Katsumi, M., Masuda, Y. and Okamoto, H. (eds): Plant Water Relations and Growth under Stress. Myu K.K. Tokyo, Japan. ISBN 4-943995-03-9. pp. 201-208.

ERDEI, L. and **TALEISNIK**, E. 1993. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. - Physiol. Plantarum 89, 381-387.

ERDEI, L., **SZABÓ-NAGY**, A. and **LASZLAVIK**, M. 1994. Effects of tannin and phenolics on the H^+ -ATPase activity in plant plasma membrane. - J. Plant Physiol. 144, 49-52.

ERDEI, L., **PESTENÁ CZ**, A., **BARABÁS**, K. and **SZEGLETES**, ZS. 1995. Adaptive responses of plants under stress conditions. - Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 30, 27-37.

ERDEI, L., **SZEGLETES**, ZS., **BARABÁS**, K. and **PESTENÁ CZ**, A. 1996. Responses in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. - J. Plant Physiol. 147, 599-603.

EPSTEIN, E. 1998. How calcium enhances plant salt tolerance. - Science 280, 1906-1907.

FARMER, P.K. and **CHOI**, J.H. 1999. Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.). - Biochym. Biophys. Acta 1434, 6-17.

GALVEZ, A.F., **GULICK**, P.J. and **DVORK**, J. 1993. Characterization of the early

- stages of genetic salt-stress responses in and their amphiploid. - Plant Physiol. 103, 257-265.
- GILROY, S.** 1996. Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. - Plant Cell 8, 2193-2209.
- GÓMEZ-CADENAS, A., VERHEY, S.D., HOLAPPA, L.D., SHEN Q., HO, T-H.D. and WALKER-SIMMONS, M.K.** 1999. An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1767-1772.
- GULTINAN, M.J., MARCOTTE, W.R. and QUATRANO, R.S.** 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. - Science 250, 267-271.
- DasGUPTA, M.** 1994. Characterization of a calcium-dependent protein kinase from *Arachis hypogea* (Groundnut) Seeds. - Plant Physiol. 104, 961-969.
- HANKS, S.K. and HUNTER, T.** 1995. The eukaryotic protein kinase superfámyly: kinase (catalytic) domain structure and classification based on phylogenetic analysis. In: G. Hardie, S.K. Hanks, ed, Protein Kinase Factsbook. Academic Press, London.
- HARMON, A.C., PUTNAM-EVANS, C. and CORMIER, M.J.** 1987. A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. - Plant Physiol. 83, 830-837.
- HARMON, A.C., GRIBSKOV, M. and HARPER, J.F.** 2000. CDPKs - a kinase for every Ca^{2+} signal? - Trends in Plant Science 5/4, 154-159.
- HARPER, J.F., SUSSMAN, M.R., SCHALLER, G.E., PUTNAM-EVANS, C.L., CHARBONNEAU, H. and HARMON, A.C.** 1991. A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. - Science 252, 951-954.
- HASHIMOTO, Y. and SODERLING, T.R.** 1987. Calcium- calmodulin-dependent protein kinase II and calcium- phospholipid -dependent protein kinase activities in rat tissues assayed with a synthetic peptide. - Arch. Biochem. Biophys. 252, 418-425.
- HASEGAWA, M., BRESSAN, R. and PARDO, J.M.** 2000. The dawn of plant salt tolerance genetics. - Trends in Plant Science 5/8, 317-319.
- HEMM, M.R., HERRMANN, K.M. and CHAPPLE, C.** 2001. AtMZB4: a

transcription factor general in the battle against UV. - Trends in Plant Science 6/4, 135-136.

HOLAPPA, L.D. and WALKER-SIMMONS, M.K. 1995. The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. - Plant Physiol. 108, 1203-1210.

HOYOS, M.E. and ZHANG, S. 2000. Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. - Plant Physiology 122, 1355-1363.

JUPIN, I. and CHUA, N.H. 1996. Activation of the CaMV as- 1 *cis*-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA 1a. - EMBO J. 15, 5679-5689.

KIM, K-N., CHEONG, Y.H., GUPTA, R. and LUAN, S. 2000. Interaction specificity of Arabidopsis calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. - Plant Physiol. 124, 1844-1853.

KNIGHT, M.R., SMITH, S. M. and TREWAVAS, A.J. 1992. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4967-4971.

KNIGHT, H., TREWAVAS, A.J. and KNIGHT, M.R. 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change signature after acclimation. - Plant Cell 8, 489-503.

KNIGHT, H. and M.R. KNIGHT 2000. Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in *Arabidopsis*. - J. Exp. Bot. 51, 1679-1686.

KNIGHT, H. and M.R. KNIGHT 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. - Trends in Plant Sci. 6/6, 262-267.

KNIGHT, H., BRANDT, S. and KNIGHT, M.R. 1998. A history of stress alters draught calcium signaling pathway in *Arabidopsis*. - Plant J. 16, 681-687.

KRIZEK, D.T., KRAMER, G.F., UPADHYAYA, A. and MIRECKI, R.M. 1993. UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. - Physiol. Plant. 88, 350-358.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. - Nature 227, 680-685.

- LANDRY, L.G., CHAPPLE, C.C.S. and LAST, R.L.** 1995. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. - *Plant Physiol.* 109, 1159-1166.
- LARCHER, W.** 1987. Streß bei Pflanzen. - *Naturwissenschaften* 74, 158-167.
- LESHEM, Y.Y. and KUIPER, P.J.C.** 1996. Is there a GAS (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress? - *Biol. Plantarum* 38, 1-18.
- LEVITT, J.** 1980. Responses of plants to environmental stresses. - Vol. 1, Academic Press, New York.
- LICHTENTHALER, H.K.** 1996. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. - *J. Plant Physiol.* 148, 4-14.
- LINSE, S., HELMERSSON, A. and FORSEN, S.** 1991. Calcium binding to calmodulin in its globular domains. - *J. Biol. Chem.* 266, 8050-8054.
- LIU, J., ISHITANI, M., HALFTER, U., KIM, C-S. and ZHU, J-K.** 2000. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. - *PNAS* 97/7, 3730-3734.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. - *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- VAN DER LUIT, A.H., OLIVARI, C., HALEY, A., KNIGHT, M.R. and TREWAVAS, J.** 1999. Distinct calcium signaling pathway regulate calmodulin gene expression in tobacco. - *Plant Physiol.* 121, 705-714.
- MÄNTYLÄ, E., LANG, V. and PALVA, E.T.** 1995. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. - *Plant Physiol.* 107, 141-148.
- MASOJIDEK, J., TRIVEDI, S., HALSHAW, L., ALEXIOU, A. and HALL, D.O.** 1991. The synergistic effect of drought and light stresses in sorghum and pearl millet. - *Plant Physiol.* 96, 198-207.
- McAINSH, M.R., WEBB, A.A.R., TAYLOR, J.E. and HETHERINGTON, A.M.** 1995. Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. - *Plant Cell* 7, 1207-1219.
- MOLINA, M.J., KOLB, C.E. and MOLINA, L.T.** 1996. Gas-phase and

- heterogeneous chemical kinetics of the troposphere and stratosphere. - Ann. Rev. Phys. Chem. 47, 327-367.
- NAGY, Z., TUBA, Z., ZSOLDOS, F. and ERDEI, L.** 1995. CO₂-exchange and water relation responses of sorghum and maize during water and salt stress. - J. Plant Physiol. 145, 539-544.
- NAKAMURA, S., HAYASHI, H., MORI, S. and CHINO, M.** 1995. Detection and characterisation of protein kinases in rice phloem sap. - Plant Cell Physiol. 36, 19-27.
- OLÁH, Z. and KISS, Z.** 1986. Occurrence of lipid and phorbol ester activated protein kinase in wheat cell. FEBS Lett. 195, 33-37.
- OLÁH, Z., BÖGRE, Z., LEHEL, CS., FARAGÓ, A., SEPRÓDI, J. and DUDITS, D.** 1989. The phosphorylation site of Ca²⁺-dependent protein kinase from alfalfa. - Plant Mol. Biol. 12, 453-461.
- PANDEY, S., TIWARI, S.B., UPADHYAYA, K.C. and SOPORY, S.K.** 2000. Calcium signalling: linking environmental signals to cellular functions. - Crit. Rev. in Plant Sci. 19/4, 291-318.
- PEI, Z-M., KUCHITSU, K., WARD, J.M., SCHWARZ, M. and SCHROEDER, J.I.** 1997. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. - Plant Cell 9, 409-423.
- PERERA, L.K.R.R., MANSFIELD, T.A. and MALLOCH, A.J.C.** 1994. Stomatal responses to sodium ions in *Aster tripolium*: a new hypothesis to explain salinity regulation in the above-ground tissues. - Plant Cell Environm. 17, 335-340.
- POLLÁK, T.** (1986) PhD. Thesis,
- POLYA, G.M., DAVIES, J.R. and MICUCCI, V.** 1983. Properties of a calmodulin activated Ca²⁺ dependent protein kinase from wheat germ. - Biochem. Biophys. Acta 761, 1-12.
- POLYA, G.M., MORRICE, N.A. and WETTENHALL, R.E.H.** 1989. Substrate specificity of wheat embryo calcium dependent protein kinase. - FEBS Letter 253, 137-140.
- POLYA, G.M., WANG, B.H. and FOO, L.Y.** 1995. Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolyzable tannins. - Phytochemistry 38, 307-314.

- POOVAIAH, B.W., XIA, M., LIU, Z., WANG, W., YANG, T., SATHYANARAYANAN, P. V., and FRANCESCHI, R.** 1999. Developmental regulation of the gene for chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in anthers. - *Planta* 209, 161-171.
- SANTOS,I., ALMEIDA, J.M. and SALEMA, R.** 1993. Plants of *Zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. - *J.Plant Physiol.* 141, 450-456.
- SELYE, H.** 1936. A syndrome produced by various nocuous agents. - *Nature* 138, 32-36.
- SELYE, J.** 1966. Életünk és a stress. - Akadémiai Kiadó, Budapest.
- SHEEN, J.** 1996. Ca^{2+} - dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. - *Science* 274, 1900-1902.
- SHEN, W., GÓMEZ-CADENAS, A., ROUTLY, E.L., HO, T-H.D., SIMMONDS, J.A. and GULICK, P.J.** 2001. The salt stress-inducible protein kinase gene, *Esi47*, from the salt-tolerant wheatgrass *Lophopyrum elongatum* is involved in plant hormone signalling. - *Plant Physiol.* 125, 1429-1441.
- SHI, H., ISHITANI, M., KIM, C. and ZHU, J-K.** 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6896-6901.
- SOPORY, S.K. and MUNSHI, M.** 1998. Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signalling in plants. - *Crit. Rev. Plant Sci.* 17/3, 245-318.
- STONE, J.M. and WALKER, J.C.** 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. - *Plant Physiol.* 108, 451-457.
- SZABÓ-NAGY, A., GALIBA, G. and ERDEI, L.** 1992. Induction of soluble phosphatases under ionic and non-ionic osmotic stresses in wheat. - *J. Plant Physiol.* 140, 629-633.
- SZEGLETES, ZS., ERDEI, L., TARI, I. and CSEUZ, L.** 2000. Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. - *Cereal Res. Com.* 28/4, 403-410
- TAKEZAWA, D., LIU, Z.H., AN, G. and POOVAIAH, B.W.** 1995. Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol. Biol.* 27, 693-703.

- TEVINI, M., BRAUN, J. and FIESER, G.** 1991. The protective function of the epidermal layer of rye seedling against UV-B radiation. - *Photochem. Photobiol.* 53, 329-333.
- TRAORE, M. and SULLIVAN, C.Y.** 1988. Effect of abscisic acid seed treatment on shorghum drought responses. - *Proc. Int. Cong. Plant Physiol.*, New Delhi, India, February 15-20.
- TREWAVAS, A.J.** 1999. Le calcium, C est la vie: calcium makes waves. - *Plant Physiol.* 120, 1-6.
- TURNER, N.C. and JONES, M.M.** 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. *In* "Adaptation of plants to water and high temperature stress", N.C. Turner and P.J. Kramer, eds., Wiley, New York, pp. 87-103.
- URAO, T., KATAGIRI, T., MIZOGUCHI, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., HAYASHIDA, N. and SHYNOZAKI, K.** 1994. Two genes that encode Ca^{2+} -dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. - *Mol. Gen. Genet.* 244, 331-340.
- URAO, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., and SHINOZAKI, K.** 2000. Two-component systems in plant signal transduction. - *Trends Plant Sci.* 5, 67-74.
- WATILLON, B., KETTMANN, R., BOXUS, Ph. and BURNY, A.** 1995. Structure of a calmodulin-binding protein kinase gene from apple. - *Plant Physiol.* 108, 847-848.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., KOIZUMI, M., URAO, S. and SHINOZAKI, K.** 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to dessication in *Arabidopsis Thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembran channel protein. - *Plant Cell Physiol.* 33: 217-224.
- ZHU, J-K., LIU J. and XIONG, L.** 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis Thaliana*: evidence of a critical role for potassium nutrition. - *Plant Cell* 10, 1181-1192.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkám és a dolgozatírás során segítséget nyújtottak. Elsősorban köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Erdei Lászlónak, hogy a Stresszfiziológia és Membrántranszport csoport tagjává fogadott és éveken át támogatott tanácsaival, javaslataival. Köszönöm Dr. Lengyel Imrének és Dr. Krizbai Istvánnak szakmai kérdésekben adott segítségüket. Hálás vagyok a mindenkori technikai segítőknak, Kónya Erikának, Pál Erikának és a mindentudó Ördög Mónikának. Köszönet illeti Mitrovné Nagy Etelkát a fotók és ábrák elkészítéséért. Köszönöm a csoport minden volt tagjának, hogy baráti, jó hangulatot teremtett, ezzel is segítve munkámat. Külön köszönöm Dr. Barabás Katalinnak és Dr. Szegletes Zsoltnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk problémáimmal. Köszönöm a SZTE Növényélettani Tanszék és az SZBK Biofizikai Intézet dolgozóinak és igazgatójának együttműködését.

Hálás vagyok mindenkinek, aki ösztönzött a dolgozat megírására és lehetővé tette a megfelelő körülményeket, családomnak és barátaimnak.

10. Summary

Environmental stresses provoke similar cascade mechanisms in both plant and animal systems. Most of the external stimuli (drought, salt stress, touch and hormonal treatment) increase cytoplasmic Ca^{2+} content, making this cation the most important second messenger in plants. In the Ca^{2+} -dependent signal transduction several protein kinases take part, the most important among them being the Ca^{2+} -dependent protein kinase or calmodulin-like domain protein kinase (CDPK) superfamily. Changes in phosphorylation pattern and activity of proteins, gene induction and synthesis of new stress proteins are the most often observed phenomena under stress conditions. In the signalling process, CDPKs have a key role in the early steps of the cascade. Four types of protein kinases belong to CDPKs: Ca^{2+} -dependent but calmodulin-independent protein kinase (CDPK), Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK) and CDPK-related protein kinase (CRK). CDPK is unique with respect to its regulatory domain, containing four EF-hand, which is similar to calmodulin (Harper *et al.*, 1991).

In our experiments the CDPK was investigated under osmotic (by polyethylene-glycol, PEG), salt (by NaCl) and UV-B stress. Hydroponically grown maize (*Zea mays* L., cv. Pioneer 3950), sorghum (*Sorghum bicolor* L., Moench cv. ICSV. 112, Hyderabad, India), wheat (*Triticum aestivum* L., Tiszatáj, Kata and Mv-8) and the halophyte aster (*Aster tripolium* ssp. *tripolium*) were used as experimental material. Changes in the enzyme activity of CDPK were followed by autophosphorylation assay. The labelled proteins were detected by autoradiography. The CDPK enzyme activity and its inhibition with tannic and ellagic acid was detected by liquid scintillation method in the presence of exogenous substrate (syntide-2). In case of *Aster tripolium* Na^+ and K^+ contents of shoot were measured by atomic absorption spectrometry.

Experiments showed that 72 h of osmotic stress (200 mOsm PEG) increased the autophosphorylation intensity of a soluble Ca^{2+} -stimulated protein kinase. For the characterisation of PEG- or other stress-induced protein kinases, several biochemical properties of the proteins were studied in sorghum roots,

including Ca^{2+} - and calmodulin-dependence, effects of inhibitors and the molecular mass. The results showed that this protein kinase is Ca^{2+} -dependent and no further activation was reached by adding Ca^{2+} /calmodulin complex. In spite of the inhibition by the calmodulin antagonist trifluoroacetic acid, this kinase seems to belong to the Ca^{2+} -dependent but calmodulin-independent protein kinases. The CDPK activity measured in the presence of the oligopeptide substrate syntide-2, was differentially influenced by tannic and moderately by ellagic acid at higher concentrations. The molecular mass (52-53 kDa) was in agreement with those presented earlier for wheat and alfalfa.

The effects of osmotic, salt and UV-B stress on CDPK activity were studied in different stress-tolerant crops. Previous experiments (Erdei and Taleisnik 1993) had shown physiological differences between the drought-sensitive maize and the drought-tolerant sorghum under conditions of salt and osmotic stress. The phosphorylation level was about 10-fold higher in sorghum samples than in maize and appeared as 49- and 52-53 kDa labelled bands. The Ca^{2+} -dependent protein kinase was induced by 2-h PEG treatment in a concentration-dependent manner in sorghum roots. CDPK was organ-specific as changes in activity was localized mostly in the roots, while shoots were not affected. One of our aims was to find out the minimum induction time, since this kinase plays an important role in early signal transfer. With decreasing duration of treatments, a well-defined stress response was found in sorghum roots even after 1 h PEG treatment and with lower intensity in maize after 2 hours. With shorter period (15-30 min) of osmotic stress we could not get any induction.

The CDPK activity was measured under salt (NaCl) treatment in glycophytic wheat (Kata and Tiszatáj) and halophytic *Aster tripolium* ssp. *tripolium* species. Halophytic and glycophytic species are clearly different not only with respect to accumulation of minerals but also to the activity of CDPK. Wheat subspecies showed very low CDPK activities as compared to aster, although, in both of them increased activities could be detected under salt stress. In spite of the low CDPK activity the drought-tolerant "Tiszatáj" and the drought-sensitive "Kata" have different autophosphorylation pattern. In these experiments also, the higher stress tolerance was correlated with higher CDPK activity as in the case

of maize and sorghum. The salt-induced phosphorylation was concentration- and treatment time-dependent, like in the case of osmotic-induction. The strongest induction was found in the beginning of the treatment (after 1 and 7 h) in the alarm phase.

The UV-B treatment elevated slightly the CDPK (52 kDa) activity in wheat (Mv-8) shoot. Antioxidative enzymes and CDPK activity were drastically increased from the 7th d both in control and under UV-B treatment conditions. Most probably, other signal molecules like hydrogen peroxide, superoxide radicals and nitric oxide take part in the signal transduction pathway increasing the importance of other kinases or phosphatases.

Adaptation to the environmental stress also involves elevated amounts of free abscisic acid (ABA). Exogenously applied ABA induces gene expression and protein synthesis, causing changes in phosphoproteins and phosphorylation patterns. Preliminary experiments showed that ABA pretreatment enhanced the relative growth rate. In the case of sorghum roots 0.1 μ M ABA added 3 days before and during the osmotic stress to the nutrient solution caused a slight induction of CDPK activity, in contrast to the 2-h PEG (200 mOsm) treatment. The combined effects of PEG and ABA reduced phosphorylation by 60 %. The decreased kinase activity after ABA pretreatment suggests that this hormone induced "stress" conditions in the cytosol before the real osmotic stress, and through the Ca^{2+} -dependent protein kinases, activated the water-deficit-induced genes decreasing furthermore the effects of osmotic stress.

In nature, plants encounter more than one stress at the same time and must present an integrated response to them. When two or more signalling pathways from different stressors converge we can define it as 'cross-talk'. Several abiotic stress pathways share common elements that are potential 'nodes' for 'cross talk'. Most probably CDPKs function as 'nodes' besides calcium and other calcium-regulated proteins, MAPK cascades and transcription factors. The stress-induced CDPK takes part in the ABA-induced signal transduction and connect the enzymatic and hormonal responses.